

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H.J. Sinell

"Veränderungen des Kollagenvolumens bei der
Herstellung von Dosenbrühwürstchen und
Hackbratenkonserven"

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wolfgang Woltersdorf
Tierarzt aus Greifswald

Berlin 1963
Journal-Nr. 449

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H.J. Sinell

"Veränderungen des Kollagenvolumens bei der
Herstellung von Dosenbrühwürstchen und
Hackbratenkonserven"

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wolfgang Woltersdorf
Tierarzt aus Greifswald

Berlin 1963
Journal-Nr. 449



Gedruckt mit Genehmigung
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. H.J. Heidrich
Referent: Prof. Dr. H.-J. Sinell
Korreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Lerche

Tag der mündlichen Prüfung: 18. XII. 1963

MEINEN ELTERN GEWIDMET

Inhaltsverzeichnis

Seite

A) Einleitung	1
B) <u>Literaturübersicht</u>	
a) Rückblick auf die histologische Wurst- und Fleischwarenuntersuchung und Entwicklung der histometrischen Kollagenbestimmung	2
b) Färbemethode	7
c) Aufbereitung des Untersuchungsmaterials	9
d) Technologisch bedingte Einflüsse auf Histostruktur und tinktoriellcs Verhalten von Geweben	11
C) <u>Eigene Untersuchungen</u>	
a) Untersuchungsmaterial und Methode der histologischen Aufbereitung	20
b) Histometrische Untersuchung der Schnitte und statistische Auswertung der Ergebnisse	26
c) Der methodische Fehler	28
d) Ergebnisse	28
e) Modellversuche	36
D) Besprechung der Ergebnisse	45
E) Zusammenfassung	55
F) Literaturverzeichnis	57

A) E i n l e i t u n g

Bei der histologischen Untersuchung von Fleischwaren geht es analog den Zielen der klassischen Histologie darum, Gewebe zu analysieren, um somit die Zusammensetzung der Fleischwaren qualitativ zu erforschen.

In neuerer Zeit dient jedoch die histologische Untersuchung nicht nur der Erkennung von Gewebestandteilen, die entweder grundsätzlich oder nur für bestimmte Fleischwaren oder Qualitäten unzulässig sind, sondern sie versucht auch, den Anteil der Bestandteile zu ermitteln.

Im Vordergrund stehen qualitätsmindernde Bestandteile wie Sehnen, Faszien, Schwarten usw., also Substanzen, die als "Kollagen" bezeichnet werden. Die Frage nach der Menge der kollagenen Substanz gewinnt ihre Berechtigung aus deren geringem ernährungsphysiologischem Wert. Wert und Qualität einer Fleischware sind daher weitgehend von der Anwesenheit kollagener Substanzen bestimmt. Grundlage für die Qualitätsbeurteilung durch die amtliche Lebensmittelüberwachung ist daher heute die histometrische Ermittlung des Kollagengehaltes. Gegen die Ergebnisse dieser Untersuchungen wird häufig der Einwand erhoben, der Fleischwarenhersteller würde oft zu Unrecht bestraft, da Muskel-eiweiß und kollagenes Eiweiß beim Erhitzen unterschiedlichen Schwund aufweisen. Im Endprodukt würde dadurch eine relative Vermehrung des Kollagens vorgetäuscht. Derartige Verschiebungen der Volumenrelationen treten bei verschiedenen technologischen Prozessen und namentlich bei der Herstellung von hochoverhitzten Dosenenergieprodukten auf.

Daher soll die vorliegende Arbeit zur Klärung der Frage beitragen, ob und in welchem Maße eine Volumenänderung des Kollagenanteils bei der Herstellung von Dosenwürstchen und autoklavierten Hackbraten-Konserven stattfindet.

B) L i t e r a t u r ü b e r s i c h t

- a) Rückblick auf die histologische Wurst- und Fleischwarenuntersuchung und Entwicklung der histometrischen Kollagenbestimmung

Am Anfang unseres Jahrhunderts begann Striegel (1917) mit Hilfe chemischer Methoden die kollagene Substanz zu erfassen. Zur vollständigen Beurteilung von Wurstwaren reichten aber chemische Nachweismethoden nicht aus. Auf dieser Erkenntnis des Nahrungsmittelchemikers Seel (1919) fußten die zahlreichen Verfahren der histologischen Wurstuntersuchungen. Godebille (1912) beschrieb schon vorher die Erkennungsmerkmale verschiedener Gewebe. Er, Jaeger (1910) und Ziegler (1941) wiesen unabhängig voneinander darauf hin, daß auf diese Art und Weise die gewebliche Zusammensetzung von Fleischwaren ausreichend sicher ermittelt werden könne.

Seel, Zeeb und Reiling (1919) gaben einen umfangreichen Überblick über die in Wurstwaren vorkommenden Organ- und Gewebearten und beschrieben eingehend deren typische Merkmale. Späterhin gingen sie von Zupfpräparaten zur histologischen Untersuchung von Gefrierschnitten über, da diese Methode einen umfassenderen Überblick über die Zusammensetzung von Wurstwaren gestattete. Seel, Zeeb und Reiling sowie auch Braunert (1921) hielten die histologische Untersuchung zur Qualitätsbeurteilung von Fleisch- und Wurstwaren für unerläßlich. Insbesondere galt es, dabei geringwertige Gewebe- und Organteile wie z.B. Kollagen, Euter, Vormagen, Speicheldrüsen, Lunge usw. sowie die für den menschlichen Genuß untauglichen Organ-

teile wie Augen, Hoden, Gebärmutter, Ohrmuscheln u.a. festzustellen. Ebenfalls pathologisch veränderte Gewebe seien hierdurch gut darzustellen. Dasselbe konnte von Lund und Schröder (1928) selbst an gekochten und zerkleinerten Lebern einwandfrei diagnostiziert werden.

In den folgenden Jahren galt es nun, diese neuen Untersuchungsmethoden zu verbessern und weiterzuentwickeln, um auch der nun einsetzenden Kritik entgegentreten zu können. So z.B. stellte Edelmann (1920) eine eindeutige Aussagemöglichkeit über die in Wurstwaren verarbeiteten Gewebe- und Organarten in Frage. Schwerdt (1931) als Interessenvertreter deutscher Fleischwarenhersteller versuchte, den Wert der histologischen Untersuchung einzuschränken und anzuzweifeln, indem er die Fähigkeit, verbotene Fleischteile mit den bisherigen Methoden zu erkennen, nur einigen wenigen Spezialisten zusprach. Auch Draeger (1933) hob später nochmals hervor, daß der in der Lebensmittelüberwachung tätige Tierarzt nur dann aus dem histologischen Bild richtige Schlüsse ziehen könne, wenn er die normale Zusammensetzung von Fleisch- und Wurstwaren kenne und die durch die Bearbeitung veränderten Gewebs- und Organteile einwandfrei diagnostizieren könne.

Hatte man sich zunächst auf qualitative Aussagen der Bestandteile einer Wurstware beschränkt, so trat in neuerer Zeit das Bemühen um die Ermittlung der quantitativen Zusammensetzung immer mehr in den Vordergrund.

Klimmek hob schon 1925 in diesem Zusammenhang

hervor, daß der Mengenanteil der einzelnen Bestandteile auf Grund der histologischen Untersuchung nur geschätzt werden könne, sofern eine gute Durchmischung des Wurstgutes vorläge. Auch Kammel (1955) hielt die histologische Untersuchung der chemischen und grobsinnlichen für weit überlegen. Man könne durch zahlreiche histologische Schnitte einer Wurst ungefähre Mengenanteile festlegen. Die Mengenbezeichnungen "sehr viel", "viel" oder "wenig" hielt Claußen (1937) in diesem Zusammenhang für ungeeignet. Er stellte für Leberwurst Standardpräparate mit einem bestimmten Lebergehalt her. Durch einen Vergleich mit Leberwürsten unbekannter Zusammensetzung konnte der Lebergehalt auf 5 % genau ermittelt werden. Dagegen forderten sowohl Pohl (1939) als auch Röhner (1939) die Untersuchungsergebnisse nicht in Zahlen, sondern in allgemeinen Begriffen wie "vereinzelt, in ausreichender Menge, geringer, mäßiger oder reichlicher Menge" anzugeben. Die Mängel und Fehlerquellen seien noch zu groß, um sich durch Zahlenangaben festzulegen (Westphal (1942) und auch Heine 1941).

Kotter (1957) forderte dann im Bestreben nach einer Objektivierung und Vereinheitlichung der Untersuchungsergebnisse eine Normung der Mengenbezeichnungen "viel, wenig" usw.. Besonders bei einem Vergleich mit chemischen Analysen komme man zu unterschiedlichen Ergebnissen, da die histologischen Untersuchungen sich sowohl auf die fett- und wasserfreie Substanz bezögen als auch Volumenrelationen ermittelt werden. Verfälschungen mit unzulässigen Organen spielten

in den letzten Jahren in der Lebensmittelüberwachung nur eine geringe Rolle. Um so häufiger waren aber Beanstandungen wegen überhöhten Kollagengehaltes erforderlich. Die Forderung nach Zuverlässigkeit quantitativer Aussagen wurde darum desto dringlicher.

Obwohl schon früher Bodrossy (1942) eine histometrische Methode zur Erfassung der Gewebskomponenten vorgeschlagen hatte, blieb dieses Verfahren trotz des großen Bedürfnisses für eine quantitative Aussage lange Zeit völlig unbeachtet. Bodrossy versuchte die später als sogenanntes Zeichen-Wäge-Verfahren bekannt gewordene Methode aus der Mineralogie in die Wurst-histologie zu übertragen. Dieses Integrationsverfahren beruht auf einer Beobachtung von Delesse (1847, 1848), wonach sich gleichartige Teilflächen vieler Querschnitte durch einen Mischkörper ebenso verhalten wie deren Teilvolumina.

Leinati und Scolari (1950) wiesen erfolglos auf das Zeichen-Wäge-Verfahren hin, bei dem das auf Papier projizierte histologische Bild nachgezeichnet wird und die einzelnen Komponenten ausgeschnitten und abgewogen werden. Die Gewichtsverhältnisse verhalten sich wie die Volumenanteile.

Erst Kotter (1955) gelang es, diese Methode der Wursthistologie zugänglich zu machen. Auf dem Delesse'schen Integrationsprinzip beruhen 3 histometrische Verfahren: Flächenmessung, Streckenmessung und das Punktzählverfahren.

Nach den beiden letztgenannten Verfahren arbeiten einerseits der Integrations-Tisch, zum anderen das Integrations-Okular und der Point-counter. Prändl's (1961) Verdienst war es, einen rationell arbeitenden Point-counter konstruiert und diesen in die Wursthistologie eingeführt zu haben. Er besteht aus einem Mikroskop auf dessen Kreutztisch ein Objektführer aufgeschraubt ist. Dieser Objektträger ist mittels einer flexiblen Welle mit einem Schaltgerät gekoppelt. Das Drücken einzelner Tasten bewirkt einen schrittweisen Vorschub des Objektes unter dem Fadenkreuz und gleichzeitige Registrierung von Treffern. Die Trefferzahlen der verschiedenen Komponenten verhalten sich zueinander wie deren Volumina.

Diesen von Prändl konstruierten Point-counter wandelte Wegener (1962) dahingehend ab, daß er die rein mechanische Vorschubeinrichtung durch eine elektromagnetische Konstruktion ersetzte. Der seitliche Vorschub des Objektführers durch Tastendruck an einem Zählgerät erfolgt nunmehr durch einen Elektromagneten, der auf dem Kreutztisch des Mikroskopes aufgeschraubt ist.

Vergleichende Untersuchungen Prändl's (1962) mit dem Integrationstisch, dem Integrations-Okular und dem Point-counter ergaben keine wesentlichen Unterschiede in den Ergebnissen. Aber das Auswerten mit dem Integrations-Okular erforderte 3 x soviel und mit dem Integrations-Tisch sogar 5 x soviel Zeit wie gleiche Messungen mit dem Point-counter. Der geringere Zeitaufwand schränkt die Zuverlässigkeit dieser

Methode nicht ein.

b) Färbemethoden

Für die Ermittlung des Kollagenanteils in Fleischwaren ergibt sich die Forderung, Kollagen und Muskulatur eindeutig zu differenzieren. Dafür kommen bestimmte Bindegewebsfärbungen in Betracht.

Für den histometrischen Nachweis des Kollagens stellte Prändl (1958) 3 Grundforderungen auf:

- 1) exakte Differenzierung der abzugrenzenden Substanzen,
- 2) in sich einheitliche Anfärbungen von Kollagen und Nichtkollagen,
- 3) einen deutlichen Farbkontrast.

Heute werden im wesentlichen zwei Kollagenfärbungen angewendet:

- 1) die Calleja-Färbung,
- 2) die von Kotter modifizierte Azan-Färbung.

Der mangelnde Farbkontrast bei erhitztem Material wurde von Kotter (1959) bemängelt - er wandelte aus diesem Grunde die Heidenhain'sche Azan-Färbung ab. Die letztgenannte Färbung mit einem Anilinblau-Orange-Eisessiggemisch hat sich bei Kotter, Degenkolb und Elfert (1955) sowie Kotter und Prändl (1959), bei Lochmann (1962) und auch bei Beller (1960) unter gleichzeitiger Berücksichtigung von Einfachheit, deutlicher Differenzierung und Sicherheit als gut geeignet gezeigt. Das gilt in erster Linie für hitzebehandelte Waren, z.B. für Brühwürste. Bei dieser Färbung werden die Zellkerne und die Feinstruktur nicht dargestellt. Der Färbeeffekt

beruht nach Kotter und Prändl (1956) darauf, daß bei Erhitzung das nichtkollagene Eiweiß koaguliert, also seine Struktur verdichtet, während das kollagene Eiweiß verleimt, also seine Struktur auflockert. Das größere Anilinblaumolekül kann deshalb in das Kollagen eindringen, nicht aber in das Nichtkollagen. Andererseits kann zwar das kleinere Orange-Molekül sowohl in das Kollagen als auch Nichtkollagen eindringen, - wird aber vom Anilinblau im Kollagen wieder verdrängt. Demnach wird Kollagen blau gefärbt, während Nichtkollagen Gelbfärbung zeigt.

Nach Gerigk (1961) vermögen nur die substanzspezifischen Färbungen den heutigen Verhältnissen Rechnung zu tragen, denn die heutigen Feinstzerkleinerungsmaschinen zerstören die Gewebestrukturen derartig, daß diese häufig morphologisch nicht mehr zu differenzieren sind. Auch Kersch (1956) und Knoch (1956) haben die Eignung der Anilinblau-Orange-Färbung geprüft und gefunden, daß damit bei Brühwürsten geringste Mengen Kollagen nachzuweisen seien. Trotz der Möglichkeit einer farblichen Differenzierung zwischen Kollagen und Nichtkollagen ergaben sich aber bei der histometrischen Auswertung bei nach dieser Methode gefärbten Brühwurstschnitten Schwierigkeiten. Bei dieser Wurstart traten mitunter Mischfarben auf - es handelte sich um grünliche Farbtöne, die sich bei Mischung von gelb und blau ergaben. Diese Mischfarben erschwerten mitunter die Auswertung der Präparate erheblich. Lochmann (1963) sieht in der Feinstzerkleinerung des Brätes die Ursache

für die Mischfarben dieses Muskelschaum-Kollagen-Gemisches.

Eberlein (1961) wandte die Kotter-Färbung bei Rohwurstuntersuchungen an, und auch er erprobte dabei die von Prändl (1961) vorgeschlagene Erhitzung in der feuchten Kammer, um die notwendige Verleimung des Kollagens zu gewährleisten. Die Eignung der Anilinblau-Färbung an Leberwürsten konnte Hahn (1962) in seiner Dissertation bestätigen. Forschner (1962) sowie Linke und Schadek (1963) nahmen sich des Problems der Beeinflussung des Kollagenvolumens durch die Färbemethode an. Dabei ergaben sich für erhitztes Material annähernd gleiche Werte zwischen H.E.-, Calleja- und Kotter-gefärbten Vergleichspräparaten. Höhere Kollagenvolumenwerte ergaben sich nur bei einem Vergleich zwischen den Ergebnissen der H.E.- bzw. Calleja-Färbung und der nach vorbereitender Hitzebehandlung und anschließender modifizierter Azanfärbung gefärbten Präparate.

Linke und Schadek (1963) untersuchten den Einfluß der mikroskopischen Präparationstechnik auf die Volumenveränderung des Muskel- und Kollagengewebes. Danach unterliegen die Gewebe während der Präparations-Abschnitte unterschiedlichen Veränderungen des Volumens, das aber bei Fertigstellung des histologischen Schnittes wieder annähernd den Ausgangswert erreicht hat.

c) Aufbereitung des Untersuchungsmaterials

Ein besonderer Mangel der quantitativen Auswertung besteht darin, daß durch unterschied-

liche Verteilung und ungleiche Partikelgröße der Gewebe in einigen Fleischwaren die Ergebnisse einer breiten Streuung unterliegen und somit unterschiedliche Zuverlässigkeiten aufweisen. Bei Materialien deren Komponenten extrem ungleichmäßig verteilt oder ungleich groß sind, kann deshalb aus nur wenigen Schnitten kein repräsentativer Querschnitt erlangt werden. Kotter (1955) empfahl aus diesem Grunde die Vorzerkleinerung mit dem Fleischwolf. Durch gleichmäßige Zerkleinerung und Einbettung versuchten Kotter und Prändl (1959) den mittleren Fehler zu verringern und die erforderliche Schnitzzahl zu reduzieren.

Prändl (1961) schlug im Bestreben nach einer Standardisierung vor, die Proben im Wolf zu zerkleinern, nach der Na-Alginat-Einbettung das Blöckchen auf dem Mikrotom zu schneiden (40 μ) und gründlich zu durchmischen. Lochmann (1962) und auch Eberlein (1961) unterstrichen ebenfalls diese Forderungen. Eberlein erhielt z.B. einen fast doppelt so hohen Varianzquotienten bei unzerkleinertem Material als bei der homogenisierten Probe.

Durch die Verwendung eines Mixgerätes koppelte Sinell (1961) im wesentlichen 3 Arbeitsgänge: Vorzerkleinerung, gründliche Durchmischung und Entfettung mit Methylenchlorid zur Alginat-Einbettung. Er sieht darin eine wesentliche Vereinfachung der histologischen Aufbereitung sowie eine große Zeitersparnis.

Bentler (1962) verglich Mixer, Homogenisator, Gefriermikrotom und Tischkutter miteinander. Bei der Verwendung des Tischkutters fiel seiner Meinung nach das Aufwickeln der sehnigen Bestandteile um die Messer (Mixer) weg, da das Wurstgut nicht im Scherenschnitt- bzw. Quetschverfahren, sondern wie auf einem Wiegeklotz geschnitten würde.

Poisson (1943) hat an der Gelatine-Einbettung bemängelt, daß bei Kollagenfärbung die Gelatine nicht sicher von verklebtem Bindegewebe zu differenzieren sei. Poisson empfahl deshalb die Einbettung mit Gelose (Agar-Agar) - Paraffin, da dieser Methode die Mängel der Gelatineeinbettung nicht anhafteten. Ebenso schloß sich Kotter (1955) dieser Meinung, die Gelatineeinbettung sei ungeeignet, an. Er empfahl Agar an Stelle von Gelatine.

Prändl (1961) führte in die Histologie als Einbettungsmittel Na-Alginat ein, weil dies bei Spezial-Bindegewebsfärbungen nicht wie Gelatine oder Agar angefärbt wird. Eine Vermischung des heißen Agars mit einer gewissen Menge verklebten Kollagens beim Zusammenmischen, die doch zu einer schwachen Blau-Färbung des Agars führte, wird durch Na-Alginat vermieden.

- d) Technologisch bedingte Einflüsse auf Histostruktur und tinktoriellcs Verhalten von Geweben

Untersuchungen über die Frage, inwieweit die histologische Erkennbarkeit von Geweben und Organen durch die bei der Herstellung auftretenden Alterationen leidet, nehmen in der

Literatur breiten Raum ein. Z.B. erschwert die Zerkleinerung und umfassende Zerstörung der verschiedenen Gewebe oder Organe im Herstellungsprozeß von Fleischwaren die Erkennbarkeit ihrer geweblichen Komponenten.

1) Zerkleinerung

Nach Ansicht von Mayer (1922), Frickinger (1928), Lund und Schröder (1928; 1930) sowie Alterauge (1937) und auch Endress (1944) stellt die Zerkleinerung zwar eine schwere Beeinträchtigung dar, doch würden die einzelnen Gewebe nicht so weitgehend geschädigt, daß ihre Erkennbarkeit ausgeschlossen wäre. Stets fänden sich gewisse Merkmale bzw. Anhaltspunkte, die für bestimmte Gewebsarten oder Organe auch nach der Zerstörung charakteristisch seien. Frickinger (1928) warnte in diesem Zusammenhang vor einer zu speziellen Formulierung der Untersuchungsergebnisse. Z.B. interessiere nicht die Identifizierung einzelner Darmabschnitte, sondern das Ergebnis: Verdauungstrakt. Lund und Schröder (1928) konnten trotz Kochen und Zerkleinern pathologisch verändertes Lebergewebe ausreichend erkennen.

In den letzten Jahren sind durch die technische Vervollkommnung in der Fleischzerkleinerungstechnik wesentliche Fortschritte erzielt worden. So wurden die nach dem Schneidprinzip arbeitenden Kutter vervollkommnet und die Kolloidmühlen entwickelt, die bekanntlich nahezu die Qualität eines Homogenisators erreichen. Bei Verwendung dieser

Zerkleinerungsmaschinen wird z.B. Lebergewebe soweit zerstört, daß nur noch interstitielles Bindegewebe mit einigen anhaftenden Leberzellen sowie einzelne freiliegende Leberzellen sichtbar sind.

Nach Meinung Schönbergs (1957; 1958; 1961) entsteht bei der Brühwurstherstellung nach der Péptisation aus den Skelettmuskelfasern ein Schaum, der das Muskelgewebe morphologisch kaum noch erkennen läßt. Danach geht Muskeleiweiß mit Kollagen eine innige Verbindung ein. Der Zerkleinerungsprozeß wirkt sich selbstverständlich auch auf das kollagene Gewebe aus. Die "aufgelockerten" und zerrissenen Kollagenteilchen werden infolge der neben der Zerkleinerung einhergehenden Mischung durch die Maschinen mit dem Muskelschaum vermischt und beherrschen anschließend das histologische Bild.

Den Kuttervorgang haben auch Gisske und Grau (1955) sowie Böhm (1956) histologisch verfolgt. Ihre Darstellungen stehen allerdings im Widerspruch zu denen Schönberg's (1957), nach dessen Ansicht der größte Teil der Muskelfasern trotz des Kutters seine Struktur behält. Kotter und Prändl (1956) bestätigen durch ihre Arbeiten die Darstellungen Gisskes und Grau's sowie Böhm's. Dabei handle es sich bei der unspezifischen geformten wabigen Masse in Brühwürsten um zerkleinertes und herausgelöstes Muskeleiweiß.

Linkes (1959) Untersuchungen über den Zerkleinerungsgrad von Brühwurstbrät ergaben ebenfalls, daß mit zunehmender Zerkleinerung das histometrisch ermittelbare Kollagenvolumen abnimmt.

Rehan (1956) vertritt die Meinung, daß Organe nach Kolloidmühlen-Passage ihre typische Struktur verlieren und deshalb nur schwer oder gar nicht nachzuweisen seien. Demgegenüber konnte Schönberg (1956) nachweisen, daß auch bei stärkster Zerkleinerung Schwarte nicht soweit zerstört würde, daß ihre Komponenten wie Talgdrüsen, Haarwurzeln, Haarknäueldrüsen und Musculi arrectores pilorum nicht mehr zu identifizieren seien. Sowohl Maresch (1951) als auch Skulberg (1954) bestätigen diese Ausführungen. Letzterer untersuchte den Einfluß der Zerkleinerung auf die Teilchengröße von Herzmuskulatur, Speicheldrüsen, Euter- und Lunge und stellte fest, daß diese Organe im Gegensatz zu Leber und Niere deutlich nachweisbar seien. Linke (1959) konnte sogar Gehirn in Brühwürsten nachweisen.

Kotter (1955) weist darauf hin, daß der Lebernachweis erschwert werde, weil isolierte Zellen des Milz- und Nierengewebes in ihren Strukturen gewisse Ähnlichkeiten mit Leberzellkernen aufweisen und auch die spezifisch für Leber angesehenen Gitterfasern besäßen.

Nach Meinel (1961) sind nach 1- bis 2-maliger Kolloidmühlen-Passage die Zellkerne der Skelettmuskulatur schwerer zu erkennen, während die Querstreifung sogar nach 2- bis 3-maliger Passage erhalten bleibt. Auch Schwartengewebe sei erkennbar.

Da die strukturelle Auswertung nach Kutterung oder Zerkleinerung durch Vibrations-Kolloidmühlen immer schwieriger wurde, forderte und entwickelte Kotter (1957) eine Färbung, die auch die unstrukturierten Anteile einwandfrei differenziert.

2) Erhitzung

Die Erhitzung einiger Fleischwaren stellt neben der Zerkleinerung einen weiteren erschwerenden Faktor für den Histologen dar. Nach Braunert (1921) verändert das Kochen die Struktur der Gewebe nicht soweit, daß die histologische Erkennbarkeit dadurch in Frage gestellt wird. Durch die Hitzekoa-gulation werden die Gewebe sogar gehärtet und fixiert. Lund und Schröder (1928) bestätigen diese Ergebnisse. Darüber hinaus stellen sie fest, daß Epithelzellen beim Kochen stark quellen, weshalb Drüsen später im histologischen Bild keine Hohlräume aufweisen. Trotz Zerkleinerung und Kochen konnten Lund und Schröder pathologisch verändertes Lebergewebe ausreichend erkennen. Nach Hadi (1930) wird durch das Kochen sogar eine wesentlich bessere Kernfärbung erreicht. Auch Glien (1939), Hartmann (1940) sowie Skulberg (1954) betonten nochmals, daß Leber-

gewebe durch Zerkleinerung und Kochen am stärksten geschädigt würde, während nach Skulberg (1954) die Veränderungen des Myokards, der Speicheldrüsen und des Eutergewebes nur wenig die histologische Erkennbarkeit beeinträchtigen. Selbst nach 5-stündigem Kochen von Skelettmuskulatur konnten Lucam und Mathieu (1942) die Querstreifung der Muskelzellen nachweisen.

Die Erhitzung verändert Fleisch insofern, als das Muskeleiweiß koaguliert und das Kollagen verleimt. Ewald (1919) schrieb, daß sich kollagene Fasern "im kochenden Wasser plötzlich verkürzen" und dabei dicker und glasig würden. Die Bindegewebsfasern verlieren nach Braunert (1921) ihre feine Streifung, wodurch das Kollagen homogen erscheint. Mayer (1922) bestätigte die Ergebnisse Braunert's, erklärte aber, das Bindegewebe werde unterschiedlich beeinflusst, je nachdem, ob es sich um lockeres oder straffes Bindegewebe handle. Bei lockerem Bindegewebe werden die Bindegewebszellen und -fasern durch das Kochen in ihren Verbänden gelockert, die Kitt- und Fasersubstanzen fangen an zu quellen und somit entsteht aus dem Bindegewebe eine homogene gequollene strukturlose Masse. Das Hyalin wird vollkommen in Leim überführt. Demgegenüber behalten Sehnen und Faszien (straffes Bindegewebe) weitgehend ihre typische Struktur.

Küntzel (1937) gibt 40°C als die Temperatur an, bei der günstigstenfalls der Verleimungsvorgang eintritt. Durch Essig- oder Salzsäure sowie durch weniger als 10 % Zugabe von NaCl

wurde die Verleimungstemperatur des Kollagens herabgesetzt (Küntzel).

Im Gegensatz zu Küntzel vertreten Cherbulliez, Jeannerat und Mayer (1938) die Ansicht, daß durch Verleimung schon Gelatine gebildet werde. Die Verleimungsreaktion besteht ihrer Ansicht nach aus der reversiblen Schrumpfung und einer irreversiblen Hydrolyse durch Hitzeeinwirkung. Die Schrumpfung sei nur dann irreversibel, wenn die Wasserlöslichkeit der Moleküle durch Hydrolyse zunehme.

Während Knoch (1956) die Quellung des Kollagens auf die Feinstzerkleinerung zurückführt, konnte Hecht (1957) durch histologische Verfolgung des Verleimungs- und Strukturauflösungsvorganges feststellen, daß die Quellung des Kollagens beim Brühen eintrete. Außerdem beobachtete er, daß sich unterschiedliche Brühzeiten nur unwesentlich auf das Kollagenvolumen auswirken.

In seinen Untersuchungen über Auswirkungen der Färbemethode auf histometrisch ermittelbare Kollagenvolumina konnte Forschner (1961;1962) auch den Einfluß der Erhitzung auf Muskel-Kollagen-Gemische verfolgen. Die zur modifizierten Azanfärbung durch Hitzebehandlung vorverleimten Proben des gleichen Materials ergaben erheblich höhere Kollagenvolumina, als die unter Verzicht auf die Vorerhitzung nach Calleja oder H.E. gefärbten Präparate. Die Konstanz der Differenzen veranlaßten ihn dazu, einen Umrechnungsfaktor abzuleiten.

Für rohes Material gibt der Autor den Faktor 0,79 an. Damit konnte er den ursprünglichen Kollagengehalt nach der Formel

$$s_1 = \frac{Su \cdot Mh}{Mu \cdot Sh} \quad \text{errechnen.}$$

$s_1 = 0,79$

M = Muskulatur

S = Sehne

h = histom. ermittelt

u = ursprünglich

Über die Einflüsse technologischer Behandlungsverfahren im Hinblick auf die Struktur und Tinktion im histologischen Bild des fertigen Erzeugnisses liegen folgende Mitteilungen vor:

Schönberg (1957; 1958; 1961) beschreibt in einigen Arbeiten den Einfluß der Erhitzung auf Brühwurstbrät:

In der fertigen Brühwurst liegt Muskeleiweiß und Kollagen denaturiert vor, d.h. Muskeleiweiß koaguliert bzw. das Kollagen verleimt weitestgehend. Während natives Kollagen im kalten Wasser unlöslich ist, geht es beim Erhitzen mit H_2O als Gelatine in Lösung. Daß auch in Brühwurst die Vorgänge stattfinden, beweisen die sich in den Hohlräumen des Brätes ansammelnden gelatinösen Massen. Das konnte Schroeder (1959) experimentell nachweisen. Das im Wurstbrät verteilte Kollagen löst sich nach Schönberg (1961) teilweise und kann sich mit dem Muskeleiweißschaum vermischen. Je höher die Brüh- bzw. Sterilisationstemperatur ist, desto umfassender ist die Verleimung und Löslichkeit.

An Hand von Untersuchungen an Brühwürsten bekannter Rezeptur konnte Gerigk (1962) feststellen, daß sowohl die Zerkleinerung als

auch die Erhitzung das Kollagenvolumen in Brühwürsten beeinflussen. Je stärker die Zerkleinerung und je höher die Erhitzung (bis 95°C) waren, desto weniger kollagene Substanz konnte ermittelt werden.

Sowohl die Untersuchungen von Wersching und Kovács (1963) als auch die Ergebnisse von Baxevanis (1962) stehen im Widerspruch zu den Untersuchungen Gerigk's. Sie verglichen zwischen 75°C und 85°C gebrühte Würstchen mit Dosenwurst (103°C) und ermittelten bei den hocheerhitzten Brühwürstchen einen höheren Kollagenanteil. Wersching und Kovács konnten allerdings noch keine Erklärung dafür geben, daß in ihren Versuchen bei ein und demselben Ausgangsmaterial, selbst bei gleichen Erhitzungstemperaturen und -zeiten die Kollagenabnahme unterschiedlich war.

In neuester Zeit ergab sich aus den Versuchen Bentler's (1963), daß weder durch die Dauer, noch durch die Höhe der Erhitzung bis zur Siedetemperatur, noch durch die Art des verwendeten Fleisches eine Zunahme des Kollagenvolumens bei Brühwürsten feststellbar war.

C) E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n

Zum Studium des Einflusses verschiedener technologi-
scher Behandlungsverfahren wurden in dem Zeit-
raum von November 1962 bis September 1963 histo-
metrische Untersuchungen an Brühwurst- und Hack-
bratenbrät durchgeführt. Das Untersuchungsmaterial
stammte aus vier Berliner Fleischwarenfabriken.
Bei Hackbraten sollte dabei verfolgt werden, wie
sich bei gewerbeüblichen Herstellungsverfahren
der Volumenanteil des Kollagens bei Verwendung
von "Fleisch wie gewachsen" verhält, um zuverläs-
sige Unterlagen für eine objektive Qualitätsbeur-
teilung zu erarbeiten.

In diesen Versuchen sollte außerdem der Einfluß
der Erhitzung auf das Kollagenvolumen des Grund-
brätes dargestellt werden.

a) Untersuchungsmaterial und Methode der histologischen Aufbereitung

Da mit der Calleja-Färbung bei erhitztem
Material das Kollagen teilweise nur schwach
darzustellen ist, wird bei hochoerhitztem und
feinzerkleinertem Material das Auge des Unter-
suchers sehr stark belastet - hierdurch wird
der laufende Untersuchungsbetrieb gestört.
Die bei erhitztem Material bewährte Anilinblau-
Orange-Färbung sollte in diesen Untersuchungen
mit der Calleja-Färbung verglichen werden. Die
Goldorange-Anilinblau-Färbung ist bei rohem
Material ohne besondere Vorbehandlung nicht
durchführbar. Zur spezifischen Anfärbung mit
Anilinblau-Orange muß für die beiden Farbstoffe
eine ausreichend unterschiedliche Affinität
des kollagenen und nichtkollagenen Eiweißes

gegeben sein. Um eine unkontrollierbare Volumenveränderung zu vermeiden, wurde daher nach dem Vorgehen von Prändl (60) versucht, durch Erhitzen des Untersuchungsgutes in einer feuchten Kammer unkontrollierbare Quellung und Lösung des Kollagens weitgehend auszuschalten.

I. Brühwürste

Die Probenentnahme erfolgte in Form einer Stufenkontrolle.

- 1) Die rohe gekutterte Masse wurde zunächst mit Methylenchlorid in einem Mixgerät entfettet, weiter zerkleinert und durchmischt. Hierbei lief der Motor jeweils nur kurze Zeit, um zu vermeiden, daß das Brät sich erwärmte bzw. bei höheren Touren über den Messern rotierte. Das gelöste Fett wurde mit dem Lösungsmittel in einer doppelten Lage Verbandsgaze ausgepreßt - dadurch wurde ein Herausschwemmen feiner Partikel verhindert. Das Lösungsmittel wurde bei jeder Probe 3- bis 4-mal erneuert. Die vollständige Entfettung war nötig, um später nach Alginateinbettung ein gut schneidbares Gefüge zu erhalten. Die an den Messern zurückbleibenden Teile wurden zerkleinert und der Grundmasse wieder zugesetzt.

Nach dieser Vorbehandlung wurde ein Teil der Masse in einer geschlossenen Petrischale bei 90° eine halbe Stunde lang im Trockenschrank erhitzt und kurz mit heißem und kaltem Wasser in einem Faltenfilter gewaschen. Die Proben blieben auf

dem Faltenfilter ausgebreitet zum Trocknen liegen.

Die rohe sowie die erhitzte feinzerkleinerte bröselige Masse wurde anschließend 24 Stunden zur Fixierung in eine 10%ige Formalin-Lösung gebracht. Nach dieser Fixierung konnte die Flüssigkeit mit einem Sehtuch abfiltriert werden. Im Anschluß hieran erfolgte die Einbettung in Alginat. Hierbei wurde statt des üblichen Alginatpulvers eine 10%ige visköse Lösung von Na-Alginat in Wasser verwendet. Das zähflüssige Na-Alginat wurden dem entfetteten Material zugegeben, in einem Mörser durchgeknetet bis eine gleichmäßig durchmischte plastige Masse entstand. Durch anschließendes Kneten mit der Hand (wegen des Formalins wurden Gummihandschuhe benutzt) konnte die Homogenisierung verbessert werden.

Aus der Brät-Alginatmasse wurden 3 bis 4 Blöckchen von 2x2x1 cm Kantenlänge geformt und in Gläschen mit CaCl_2 -Formalin gebracht. Nach ca. 20 Stunden war der Ionenaustausch zwischen CaCl_2 und Na-Alginat abgeschlossen, und es konnten die Ca-Alginat-Blöckchen auf dem Gefriermikrotom geschnitten werden.

- 2) Aus dem durch die Kolloidmühle zerkleinerten Brät wurden jeweils mit der Hand 3 pflaumengroße Kugeln geformt und in Gläschen mit 10%iger Formalin-Lösung

fixiert. Das Material war nach ca. 24 Stunden und anschließender kurzer Wässerung auf dem Gefriermikrotom gut schneidbar.

- 3) Aus 3 geräucherten und aus 3 in Dosen sterilisierten* Bockwürsten kamen jeweils 3 Segmente von ca. 2 cm Länge zur Fixierung in 10 % Formalin. Nach 24 Stunden konnten aus diesen Wurstsegmenten Gefrierschnitte hergestellt werden.

Bei sterilisierten Brühwürsten wurde außerdem den Anweisungen von Kotter (40) gefolgt. Von jeder sterilisierten Brühwurst-Charge wurden 3 Wurstsegmente (2 cm Länge) aus verschiedenen Würsten entnommen und zur Fixierung in Müllersche Flüssigkeit eingelegt (Müllersche Flüssigkeit = 2,5 g Kaliumbichromat, 1 g Natriumsulfat, 100 ml Aqua dest.). Nach 24-stündiger Fixierung wurden daraus 10 μ starke Gefrierschnitte hergestellt.

Von jeder Charge wurden 6 Schnitte mit einer Dicke von 10 μ angefertigt, und zwar 2 aus einem Blöckchen. Die aus formalinfixiertem Material hergestellten Schnitte wurden auf mit Eiweiß-Glyzerin bestrichene Objektträger aufgezogen. Der Haftstoff bestand in diesem Falle zu gleichen Teilen aus Hühner-Eiweiß und Glyzerin. Die so angefertigten Schnitte wurden nach 24 Stunden Lufttrocknung einheitlich nach Calleja in der von

Unter "Sterilisation" bei Dosenwürstchen wird im folgenden die Hoherhitzung dieses Erzeugnisses verstanden. Obgleich es sich nicht um eine Sterilisation im engeren Sinne handelt, wird dieser Ausdruck hier verwendet, um den Gegensatz zu der niedrigeren Erhitzung nicht eingedoster Brühwürste zu charakterisieren.

Krause angegebenen Modifizierung mit Carmalaun-Pikroindigokarmin gefärbt. Hierzu wurden die Schnitte 20 Minuten mit einer 0,5%igen Carmalaunlösung vor-gefärbt, ausreichend abgespült und darauf 55 Minuten in eine Küvette mit Pikroindigokarmin gestellt. Nach erneutem Spülen mit Aqua dest. erfolgte die Differenzierung in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol. Nach dem Durchlaufen der Alkoholreihe und des Xylols wurden die Schnitte mit Kanadabalsam und Deckgläschen eingedeckt. Kollagen erscheint bei dieser Färbung blau, während sich die Muskulatur grün anfärbt.

Die mit Müllerscher Flüssigkeit fixierten Blöckchen wurden ausreichend gewässert und daraus ebenfalls je Charge 6. Gefrierschnitte (Schnittdicke = 10 μ) hergestellt. Die auf die unbehandelten Objektträger aufgezogenen Schnitte wurden eine halbe Stunde bei 105°C im Trockenschrank getrocknet und alsdann 3 Minuten in Anilinblau-Goldorange-Eisessig-Lösung gefärbt, (0,25 g Anilinblau Bayer - Leverkusen, 2 g Orange G Unfried - München in 100 ml Aqua dest. lösen, 5 ml Eisessig zugeben, aufkochen und nach dem Erkalten filtrieren). Nach kurzer Differenzierung in Wasser wurden diese Schnitte nach dem Durchlaufen der Alkoholreihe und des Xylols mit Kanadabalsam und einem Deckglas eingedeckt.

II. Hackbraten:

Das geschrotete Rindfleisch-Ausgangsmaterial wurde zuerst im Fleischwolf (mittlere Scheibe) zerkleinert und durchmischt. Im Anschluß daran erfolgte die Entfettung im Mixer mittels Methylenchlorid. Die übrigen Chargen wurden nur mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Um wegen der Feinheit des Materials beim Abseihen des Fettlösungsmittels einen unkontrollierten Verlust bestimmter Partikel zu verhindern, wurde die überstehende Flüssigkeit nach dem Absetzen vorsichtig dekantiert. Die entfetteten Massen jeder Charge wurden in Petrischalen gefüllt, diese wurden dann zugedeckt und für 30 Minuten im Trockenschrank auf 110°C erhitzt. Anschließend erfolgte die Alginat-Einbettung. Bei unerhitztem Material wurde die Alginat-Einbettung nach dem Entfetten vorgenommen.

Aus jeder Charge wurden je 6 Blöckchen von $2 \times 2 \times 1$ cm Größe geformt. Je 3 davon konnten verarbeitet werden, indem je 6 Gefrierschnitte angefertigt und diese nach 24 Stunden Lufttrocknung nach Calleja gefärbt wurden.

Die anderen 3 Blöckchen jeder Charge wurden in verschließbare Gläsern zur Härtung des Alginats (Ionenaustausch) für 20 Stunden in eine 10%ige CaCl_2 -Lösung gelegt. Anschließend erfolgte nach Abgießen der Flüssigkeit eine Überschichtung mit Müllerscher Flüssigkeit. Die Blöckchen blieben 24 Stunden zur Fixierung in dieser Lösung. Aus den fixierten Blöckchen wurden in bekannter Weise 2, also je Charge 6 Gefrierschnitte, hergestellt.

Die Schnitte kamen eine halbe Stunde in n/40 HCl und wurden anschließend eine halbe Stunde bei 105°C im Trockenschrank getrocknet. Danach konnten die Schnitte sofort 3 Minuten in Anilinblau-Orange-Eisessig-Lösung gefärbt werden. In Wasser und in 70%igem Alkohol wurden sie differenziert, über die restliche Alkoholreihe ins Xylol gebracht und mit Kanadabalsam sowie Deckgläschen eingedeckt.

b) Histometrische Untersuchung der Schnitte und statistische Auswertung der Ergebnisse

Die quantitative histologische Auswertung der Schnitte erfolgte mit dem elektrifizierten Point-counter, in der von Wegener (77) angegebenen Modifikation. 580 Schnitte mußten histometrisch ausgewertet werden. Dabei wurde das Präparat in einem Abstand von 1 mm waagrecht und senkrecht mit einem Leitz-Mikroskop bei 250-facher Vergrößerung durchmustert. In dem auf diese Weise gitterförmig durchmusterten Präparat ergab der Schnittpunkt des Fadenkreuzes jeweils einen Testpunkt. Wenn kein Gewebe unter dem Fadenkreuz lag, so wurde der Schnitt durch Drücken der Leertaste weiterbewegt. Anderenfalls wurde das jeweilige Gewebestück durch eine ihm zugeordnete Taste gezählt. Bei jedem Schnitt wurden auf diese Weise mindestens 200 Treffer ausgezählt. Es konnten also der statistischen Auswertung einer jeden untersuchten Charge 1200 Treffer zugrunde gelegt werden. Die Differenz zwischen den Mittelwerten zweier unabhängig voneinander durchgeführter Versuchsergebnisse wurde mit dem T-Test überprüft. Gegeben

waren bei jeder Charge Stichproben über das gleiche Merkmal (Kollagen) mit den Umfängen N_1 bzw. N_2 , die aus zwei voneinander unabhängigen, normal verteilten Grundgesamtheiten entnommen waren. Unter Zugrundelegung der Hypothese, daß die Stichproben aus Grundgesamtheiten mit demselben Mittelwert (x_1 und x_2) stammten, war zu prüfen, ob die beiden Werte (z.B. Mittelwerte zweier Chargen oder zweier verschiedener Methoden) gleich oder ungleich waren.

Beispiel:

Zu prüfen war, ob der Unterschied der Mittelwerte zwischen rohem, gekutertem Brät und K.S.-gemahlenem Brät ein zufälliger war:

$$t = \frac{x_1 - x_2}{\sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x}')^2 + \sum (x_i - \bar{x}'')^2}{N_1 + N_2 + 2}}} \cdot \sqrt{\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2}}$$

gekutertes Material:

$$\bar{x} = 29,9 ; (x_1 - \bar{x})^2 = 11,7 \quad N = 6$$

K.S.-Material:

$$\bar{x} = 25,6 ; (x_1 - \bar{x})^2 = 2,9 \quad N = 6$$

$$t = \frac{29,9 - 25,6}{\sqrt{\frac{11,7 + 2,9}{6 + 6 - 2}}} \cdot \sqrt{\frac{36}{12}} = \frac{4,4}{\sqrt{1,46}} \cdot 1,73 = \frac{4,4}{1,2} \cdot 1,73$$

$$t = 6,33$$

d.h., für 10 Freiheitsgrade ist $t_{0,05} = 2,33$

$$t > t_{0,05}$$

Die Werte sind also signifikant unterschiedlich.

c) Der methodische Fehler

Zur Ermittlung des methodischen Fehlers der Apparatur sowie des Untersuchers wurde ein histologischer Schnitt einer Brühwurst unter möglichst gleichen Bedingungen bei gleicher Randeinstellung des Objektführers 50-mal mit dem Point-counter ausgewertet. Die Messungen hatten folgendes Ergebnis:

$$\begin{array}{ll} \text{arithmetisches Mittel} & \bar{x} = 17,8 \% \\ \text{Standardabweichung} & s = \pm 0,914 \end{array}$$

Hieraus ergibt sich, daß bei 50-maliger Untersuchung ein und desselben Schnittes jeder Einzelwert um $s = 0,914$ streut. Demnach haftet sämtlichen Einzelmessungen dieser methodische Fehler an.

d) Ergebnisse

I. Brühwurst:

Versuchsanordnung

Es wurden 6 Versuchsreihen für Brühwurstbrät mittlerer Qualität und einer Versuchsreihe einer 1. Qualität aufgestellt. Rindfleisch, Schweinefleisch, Speck, Eis, Salz und Gewürze und für das Brät mittlerer Qualität auch noch Hühnereiweiß waren die Ausgangsmaterialien des Grundbrätes. Dieses Material gelangte im gekutterten, kolloidgemahlenden Zustand nach dem Räuchern und nach dem Sterilisieren zur histologischen Aufbereitung. Zu diesem Zweck wurden jeweils aus 10 verschiedenen Stellen Proben nach etwa 20 Umdrehungen aus dem Kutter entnommen, ebenso aus 10 verschiedenen Stellen des mit

der Kolloidmühle zerkleinerten Brätes.

Aus dem gleichen Brät wurden mit einer Handspritze Bockwürste im Schweinsdarm hergestellt und 1 Stunde bei 80° C geräuchert. Ein Teil dieser geräucherten Würste wurde eingedost, mit Lake übergossen und anschließend 60 Minuten lang bei 90°C sterilisiert. In allen 6 Versuchen wurden das gekutterte Material und aus 3 Versuchsreihen auch das mit der Kolloidmühle zerkleinerte Brät in einer geschlossenen Petrischale bei 90°C erhitzt.

Ergebnis:

Zunächst wurde Brühwurstbrät im Anschluß an die einzelnen Fabrikationsabschnitte geprüft. Die Kollagenvolumenanteile sind in Tabelle I angegeben.

Tabelle I

Einfluss von Zerkleinerung, Räucherung und Sterillisation
auf das Kollagenvolumen bei der Brühwurstherstellung

Versuch	I	II	III	IV	V	VI	VII
rohes gekautertes Material	$\bar{x}$ in % $\pm S\bar{x}$ 29,90 0,39 1,53	32,10 0,055 0,58	28,90 2,56 3,91	29,50 0,117 0,84	30,25 0,063 0,61	32,75 0,394 1,53	21,83 0,665 1,99
durch K.S.- Mühle gemah- lenes Material	$\bar{x}$ in % $\pm S\bar{x}$ 25,25 0,097 0,77	26,10 0,001 0,32	25,10 0,173 1,01	24,75 0,096 0,76	27,20 0,178 1,03	28,25 0,196 1,08	18,36 0,193 1,07
geräucher- tes Material	$\bar{x}$ in % $\pm S\bar{x}$ 31,33 0,078 0,68	29,92 0,057 0,584	29,20 0,311 1,36	27,92 0,19 1,06	32,25 0,140 0,915	31,17 0,145 0,93	21,83 0,544 1,08
90° steril- isierte Dosen- wurst nach Calleja	$\bar{x}$ in % $\pm S\bar{x}$ 19,42 0,010 0,80	20,00 0,058 1,59	19,50 0,433 1,61	19,67 0,093 0,75	22,67 0,570 1,84	22,33 2,130 1,13	15,96 0,65 1,97
90° steril- isierte Dosen- wurst nach Kotter	$\bar{x}$ in % $\pm S\bar{x}$ 19,75 0,230 1,17	20,02 0,075 0,067	19,70 0,148 0,94	19,33 0,095 0,75	22,42 1,029 2,48	22,83 0,333 1,41	

 $\bar{x}$ = Mittelwert $S\bar{x}$ = mittlerer Fehler des Mittelwertes

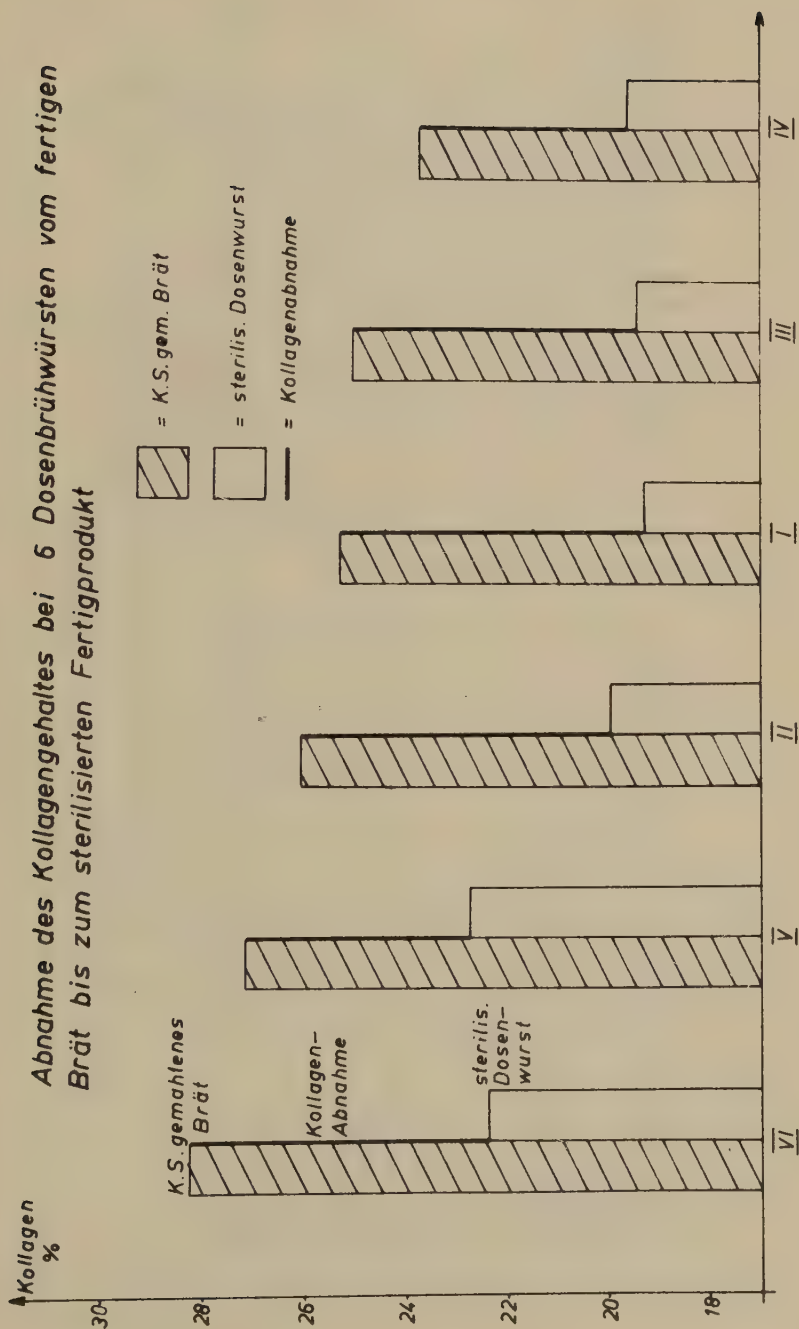
S = Standardabweichung

Mittel-Qualität

I. Qualität

Abb. 1

Abnahme des Kollagengehaltes bei 6 Dosenbrühwürsten vom fertigen Brät bis zum sterilisierten Fertigprodukt



Ergebnis:

Bei diesen Versuchen zeigte sich regelmäßig, daß nach Kolloid-Mühlen-Passage gegenüber rohem gekutterten Material das Kollagenvolumen um durchschnittlich 14 % abnahm ($p < 0,05$). Die Angabe der durchschnittlichen Kollagenabnahme erfolgt hierbei und im folgenden in Vol.%. Es wird dabei zunächst der Kollagengehalt z.B. des rohen gekutterten Brätes gleich 100 gesetzt und eine eventuelle Abnahme zu diesem Wert in Beziehung gesetzt. Auch der Grad der Erhitzung (Räucherung) beeinflusste das Kollagenvolumen, indem es durchschnittlich um 14 % wieder anstieg. Die sterilisierten Proben lagen im Kollagenanteil aber wieder um 33 % niedriger als die des rohen gekutterten Ausgangsmaterials.

In Abbildung 1 wurde der Kollagengehalt von 6 rohen, gekutterten und den dazugehörigen sterilisierten Proben durch Säulendiagramme dargestellt. Die Abnahme des Kollagenvolumens ist bei 6 untersuchten Proben etwa gleich.

Um einerseits den Grad der Quellung des Kollagens bei Erhitzung und um andererseits Bezugswerte zum sterilisierten Material (90°) zu erhalten, wurde in allen 7 Untersuchungen das rohe gekutterte und in 4 Fällen auch das kolloidgemahlene Brät auf 90°C erhitzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle II aufgeführt:

Tabelle II

Temperatureinflus auf die Kollagenvolumina bei Brühwurstbrät

Versuch	I	II	III	IV	V	VI	VII
rohes gekuttertes Material	29,90 0,29 1,53	32,10 0,055 0,58	28,90 2,56 3,91	29,50 0,117 0,84	30,25 0,063 0,61	32,75 0,349 1,53	21,83 0,665 1,99
gekuttertes Material 90° erhitzt	33,92 0,347 1,44	37,2 0,095 0,75	34,00 0,316 1,37	33,50 0,917 2,34	34,33 0,121 0,85	36,58 0,107 0,8	31,42 0,525 1,77
durch K.S.- Mühle gemah- lenes Material				24,75 0,096 0,76	27,20 0,178 1,03	28,25 0,196 1,08	18,36 0,193 1,07
K.S.-gemahlen 90° erhitzt				28,50 0,083 0,71	29,60 1,023 2,47	32,83 0,415 1,57	23,52 0,525 1,77

Aus den erhaltenen Werten konnte wiederum gefolgert werden, daß eine durchschnittliche Volumenzunahme des Kollagens sowohl zwischen rohem gekutterten und gekuttertem auf 90°C erhitzten Material als auch zwischen unerhitztem und auf 90°C erhitzten K.S.-gemahlenem Brät jeweils um 14 % zu verzeichnen war. Die Abnahme des Kollagengehaltes vom erhitzten gekutterten Material zur sterilisierten Dosenwurst, die das Maximum und Minimum des Kollagenvolumens des Herstellungsganges darstellen, konnte mit 42 % errechnet werden.

II. Hackbraten

Bezüglich der histologischen Methodik ist bei dieser Versuchsreihe folgendes zu ergänzen: Zunächst wurde bei dem Rohmaterial aus folgenden Gründen eine Erhitzung notwendig:

Da bei dieser Versuchsreihe die Ergebnisse der Calleja- sowie der Kotter-Färbung verglichen werden sollten, mußte rohes und gekuttertes Material nach der von Prändl vorgeschlagenen Methode erhitzt werden, um methodisch vergleichbare Ausgangsbasen zu schaffen.

Außerdem sollten auch die Werte des Rohmaterials mit denen des autoklavierten Hackbratens (120°C) verglichen werden.

Versuchsanordnung

6 Versuchsreihen aus "Fleisch wie gewachsen" wurden bei den Hackbraten-Untersuchungen durchgeführt. Die Ausgangsmaterialien waren Rindfleisch (grob und fein), Hühnereiweiß, Semmeln, Zwiebeln sowie Salz und Gewürze. Untersucht wurde jeweils die gekutterte, die frittierte und die autoklavierte Hackbratenmasse. Nach

etwa 20 Umdrehungen wurde an 10 verschiedenen Stellen Material aus dem Kutter entnommen und histologisch aufbereitet. Aus dem gleichen Grundbrät wurden faustgroße Klopse hergestellt und bei 120° Fett-Temperatur 5 Minuten frittiert. Ein Teil dieser frittierten Klopse gelangte zur histologischen Aufbereitung, während der andere Teil in Dosen gefüllt, mit Soße übergossen und nach dem Verschließen 1 Stunde bei 120° autoklaviert wurde. Das Rindfleisch-Ausgangsmaterial, welches zur Herstellung des Brätes Verwendung fand, gelangte nach der halbstündigen Erhitzung auf 100°C in einer Petri-Schale ebenfalls zur Untersuchung.

In Vorversuchen wurde zunächst geprüft, ob die Anilinblau-Orange-Färbung in der bei Brühwürsten üblichen Anwendungsform auch bei anderen hochehitzten Materialien wie z.B. Hackbraten, Klopse usw. eine Differenzierung des kollagenen von nichtkollagenen Eiweiß zuläßt. Dabei zeigte sich, daß aus diesen Materialien nach Fixierung in Müllerscher-Flüssigkeit nur äußerst schwierig Gefrierschnitte herzustellen waren. Aus diesem Grunde wurde das Material in Alginat eingebettet.

Danach überraschte, daß auch ein Teil des nichtkollagenen Eiweißes und das Alginat wie Kollagen angefärbt wurden. Außerdem zeichneten sich auf dem mit Eiweiß-Glyzerin präparierten Objektträger blaue Farbniederschläge ab. Auch in Alginat eingebettete Brühwürste färbten sich unspezifisch an.

Sowohl durch Änderung der Färbe- und Differenzierungszeiten als auch durch Verlängerung der Trockenzeiten konnten nur unwesentliche Verbesserungen der Differenzierung erreicht werden. Durch Änderung der Farblösung (statt 0,5 g Anilinblau wurden nur 0,25 g verwendet) konnten zwar wesentlich bessere Ergebnisse erzielt werden, jedoch ergab auch diese Abwandlung keine befriedigenden Ergebnisse.

Zuletzt wurde auf Grund eines Hinweises von Professor Kotter (briefliche Mitteilung) die substanzspezifische Anfärbung von Kollagen und Nichtkollagen dadurch zu erreichen versucht, daß die Schnitte in Lösungen mit verschiedenen pH-Werten aufgefangen wurden. Die pH-Werte wurden mit Salzsäure eingestellt.

Die Schnitte wurden auf die unbehandelten Objektträger aufgezogen, danach in eine Küvette mit Salzsäure-Verdünnungen gestellt und anschließend eine halbe Stunde im Trockenschrank bei 105°C getrocknet. Die mit höheren Salzsäurekonzentrationen vorbehandelten Schnitte zeigten wiederum blaue Überfärbungen. Dagegen zeigten schließlich die in n/40 HCl-Lösung verbrachten Schnitte sehr gute Differenzierung. Das Kollagen färbte sich leuchtend blau, nichtkollagenes Eiweiß orange-gelb. Mischfarben traten relativ selten auf. Bei einem Vergleich zwischen 3 x je 6 luftgetrockneten Schnitten und ebensoviel bei 105°C getrockneten Schnitten (also 18:18) konnte durch den t-Test bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % kein Unterschied ermittelt werden.

Ergebnis:

In Tabelle III sind die Mittelwerte und die mittleren Fehler der Mittelwerte sowie die Standardabweichung aus den vergleichenden Untersuchungen des erhitzten Rohmaterials und des autoklavierten Hackbratens angegeben.

Tabelle III

a)

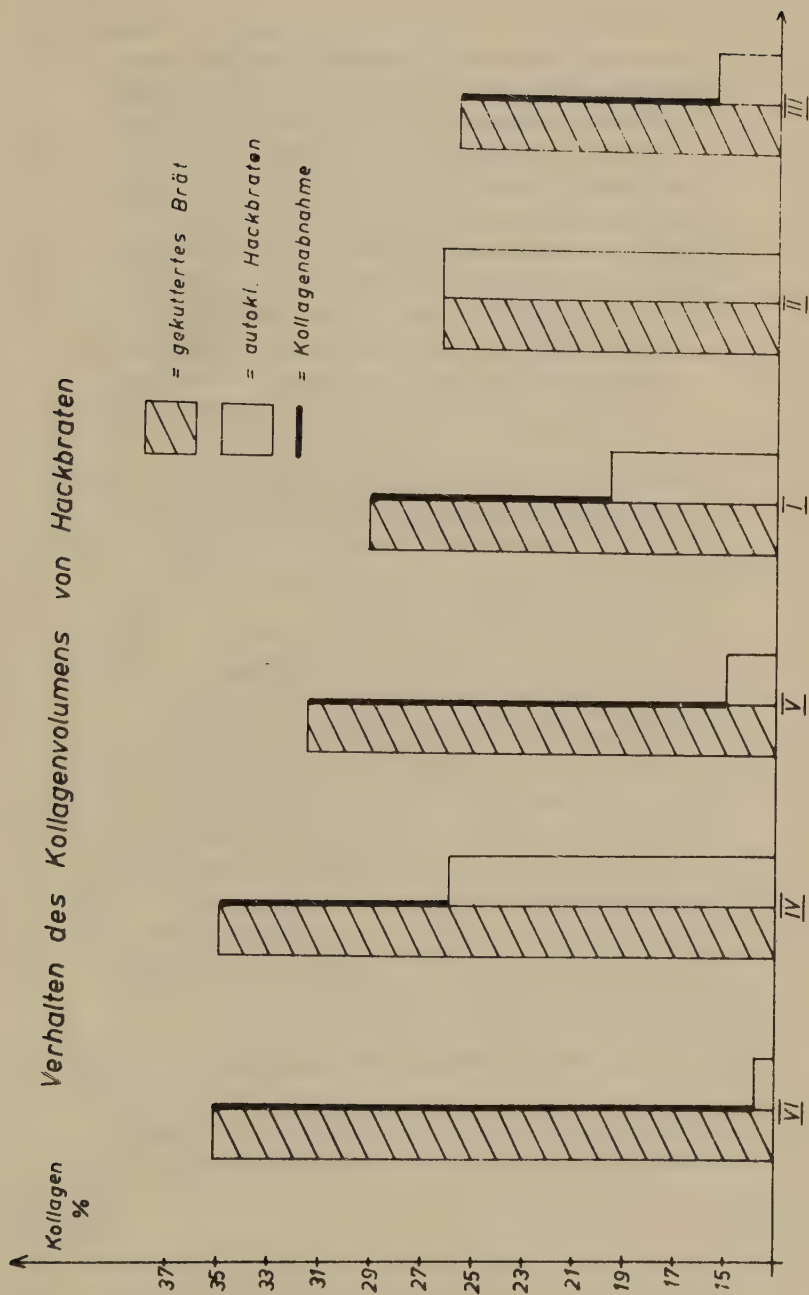
Einfluß des Frittlerens und des Autoklavierens
bei der Hackbratenherstellung

Versuch	I					
	Calleja		II		III	
	Kotter	Calleja	Kotter	Calleja	Kotter	IV
gekut- tertes Brät	$\bar{x}$ in %	$\bar{x}$ in %	$\bar{x}$ in %	$\bar{x}$ in %	$\bar{x}$ in %	$\bar{x}$ in %
	$\pm S_{\bar{x}}$	$\pm S_{\bar{x}}$	$\pm S_{\bar{x}}$	$\pm S_{\bar{x}}$	$\pm S_{\bar{x}}$	$\pm S_{\bar{x}}$
	30,15 1,23 2,71	27,72 1,529 3,03	26,16 0,843 2,24	26,58 1,48 2,50	25,58 1,173 2,65	25,25 0,383 1,51
						35,00 0,45 1,64
						31,5 1,08 2,54
						35,33
frittler- ter Klops	$\bar{x}$ in %	$\bar{x}$ in %	$\bar{x}$ in %	$\bar{x}$ in %	$\bar{x}$ in %	$\bar{x}$ in %
	$\pm S_{\bar{x}}$	$\pm S_{\bar{x}}$	$\pm S_{\bar{x}}$	$\pm S_{\bar{x}}$	$\pm S_{\bar{x}}$	$\pm S_{\bar{x}}$
	33,84 0,484 1,71	30,68 1,333 2,82	28,91 0,574 1,85	30,00 0,35 1,44	26,25 0,346 1,44	26,42 0,112 0,82
						35,91 0,124 0,86
						31,08 0,564 1,84
						34,33 0,706 2,05
Autokla- vierter Klops	$\bar{x}$ in %	$\bar{x}$ in %	$\bar{x}$ in %	$\bar{x}$ in %	$\bar{x}$ in %	$\bar{x}$ in %
	$\pm S_{\bar{x}}$	$\pm S_{\bar{x}}$	$\pm S_{\bar{x}}$	$\pm S_{\bar{x}}$	$\pm S_{\bar{x}}$	$\pm S_{\bar{x}}$
	19,69 0,798 2,18	18,38 0,807 2,20	26,80 2,518 3,89	25,72 1,285 2,77	15,28 0,164 0,99	15,50 0,117 0,836
						24,08 1,033 2,49
						15,08 0,783 2,16
						13,75 0,796 2,18
Rindfleisch- Ausgangs- material 110°ernitzzeit	$\bar{x}$ in %	$\bar{x}$ in %	$\bar{x}$ in %	$\bar{x}$ in %	$\bar{x}$ in %	$\bar{x}$ in %
	$\pm S_{\bar{x}}$	$\pm S_{\bar{x}}$	$\pm S_{\bar{x}}$	$\pm S_{\bar{x}}$	$\pm S_{\bar{x}}$	$\pm S_{\bar{x}}$
	34,25 1,299 2,79	22,97 1,42 2,92	32,67 1,568 3,06	34,30 0,000 2,23	27,58 0,453 1,64	27,67 0,622 1,93
						38,83 0,645 1,96
						35,83 0,591 1,88
						39,77 2,67 4,01

Aufbesserung des histologischen Bildes durch Hühnereweißzusatz und Kuterung

b)

Verhalten des Kollagenvolumens von Hackbraten



Die Tabelle III a bestätigt im wesentlichen das schon bei Brühwurst gefundene Ergebnis: Nach dem Autoklavieren besteht in 5 Untersuchungen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ein Unterschied zwischen dem gekutterten Brät und dem autoklavierten Klops. Versuch III bildet eine Ausnahme ($p > 0,05$) - die Werte sind gleich. In Abbildung 2 ist die Kollagenabnahme nochmals graphisch dargestellt. Hierbei fällt jedoch auf, daß die Kollagenvolumenabnahme beträchtlich variiert. So beträgt die Abnahme in Versuch V z.B. ca. 31 %, in Versuch VI sogar 61 % - dagegen in Versuch II = ± 0 % ($p < 0,05$).

Das Frittieren führt zur Kollagenvolumenzunahme gegenüber unerhitztem Brät, jedoch besteht zwischen frittiertem, und in der feuchten Kammer erhitztem Brät kein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$).

In Tabelle III b sind die Mittelwerte und die mittleren Fehler der Mittelwerte sowie die Standardabweichungen des zu dem jeweiligen Versuch gehörenden Rindfleisch-Ausgangsmaterials angegeben. Es konnte in Tabelle III a + b aufgezeigt werden, wie das histologische Bild von "Rindfleisch wie gewachsen" durch Hühnereiweiß-zusatz und intensive Kutterung in Bezug auf den Kollagenanteil des so entstandenen Brätes verändert wird. Es kam zu einer statistisch gesicherten Kollagenvolumen-Abnahme.

Die nach Calleja und Kotter gefärbten Schnitte ein und desselben Bräts ergaben jeweils gleiche Mittelwerte bzw. wiesen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % keine Unterschiede auf.

e) Modellversuche

Die stark variierenden Ergebnisse bei den Hackbratenuntersuchungen machten einige orientierende Grundlagenversuche erforderlich. Diese Modellversuche waren notwendig, da aus den im Großbetrieb durchgeführten Versuchen eine Tendenz in der Entwicklung der Kollagengehalte - wenigstens bei diesem Erzeugnis - nicht zu erkennen war. Es mußten daher wenigstens einige Faktoren untersucht werden, die einen Einfluß auf das Kollagenvolumen im Fertigprodukt haben können.

In diesem Zusammenhang war zu prüfen,

1. ob sich eine Beziehung zwischen der Abnahme des Kollagenvolumens und der Ausbildung einer Kruste beim Anbraten der Hackbraten-Klopse herleiten läßt.
2. Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Alter des Tieres und der Kollagenabnahme des aus ihm gewonnenen Materials ?
3. Spielt der Zerkleinerungsgrad des Bräts eine Rolle und welchen Einfluß besitzt der Wassergehalt eines Materials auf Quellung und Abnahme des Kollagenvolumens ?
4. Es sollte noch geklärt werden, bei welcher Temperatur die Abnahme des Kollagenvolumens beginnt und wo das Kollagendefizit verbleibt.
5. Die Frage, ob die Entfettung und Alginat-einbettung bei erhitztem und stark gekuttertem Material das Resultat beeinflussen könnten, sollte zuletzt geklärt werden.

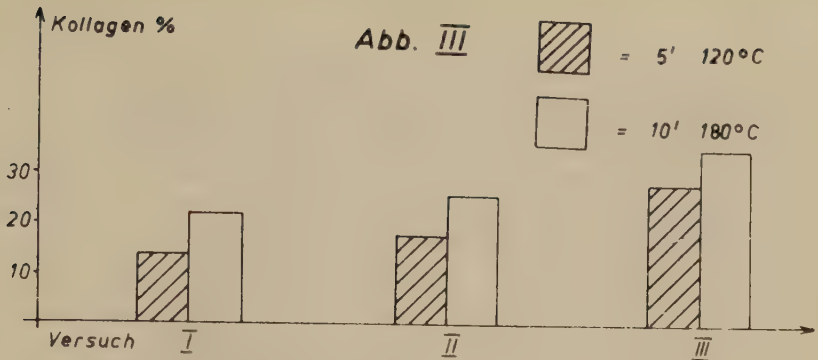
Versuchsanordnung und Ergebnisse:

In den ergänzenden Versuchen fand lediglich die Calleja-Färbung Anwendung. Es gelangten von jedem Material 6 Schnitte zur histometrischen Auswertung, deren jeweiliger Mittelwert nebst Standardabweichung und mittleren Fehler des Mittelwertes angegeben werden. Die histologische Aufbereitung entspricht im wesentlichen der in den Hauptversuchen angegebenen Methode und wird deshalb an dieser Stelle nur kurz dargestellt.

Zur Erreichung der unterschiedlichen Krustenbildung wurden 3 Hackbratenklopse aus verschiedenem Brät bei 120° Fett-Temperatur 5 Minuten lang und 3 weitere Klopse des entsprechenden Bräts 19 Minuten bei 180° frittiert, anschließend in Dosen gefüllt, Soße aufgegossen und autoklaviert (120° = 1 atü). Aus jedem Klops wurden 3 Blöckchen ausgeschnitten, in Formalin fixiert und nach 24 Stunden auf dem Gefriermikrotom geschnitten.

Die Ergebnisse werden in Tabelle IV angegeben:

Versuch		I	II	III	
A.	autokl.Hackbraten	13,75	16,42	27,25	$\bar{x}$
	5 Min. bei 120°	2,18	2,32	1,05	S
	frittiert	0,796	0,902	1,402	$S_{\bar{x}}$
B.	autokl.Hackbraten	21,58	24,58	34,50	$\bar{x}$
	10 Min. bei 180°	4,54	3,02	3,20	S
	frittiert	3,457	1,520	1,285	$S_{\bar{x}}$

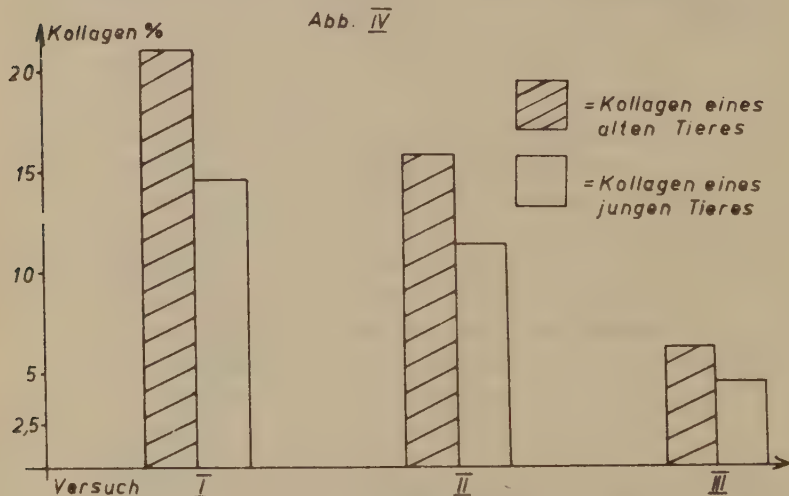


Die Ergebnisse der Spalte A weisen einen Unterschied gegenüber denen der Spalte B auf ($p < 0,05$). Durch längeres Frittieren und durch höhere Fett-Temperaturen wird also eine Abnahme des Kollagenvolumens verhindert.

In 3 anderen Modellversuchen wurde Kollagen (Aponeurosen und Faszien aus Hessenfleisch) einmal von alten Tieren, zum anderen das von Fressern bzw. Kälbern zu 6 aus Oberschale ausgeschabten Schabefleischproben zugesetzt. 100 g Schabefleisch erhielten 25 % (Versuch I + II), Versuch III nur 10 % Kollagen-Zusatz. Das Material wurde im Mörser gemischt und zu Klopsen geformt. Diese wurden in Dosen gefüllt und nach dem Aufgießen von Wasser bei 120° autoklaviert. Nach dem Autoklavieren erfolgte in üblicher Weise die histologische Aufbereitung: Einbettung in Alginat, Fixierung und Härten, sowie Schneiden.

Tabelle V

Versuch		I	II	III	
A	Zusatz von	$\bar{x}$	20,7	15,5	6,58
	Kollagen eines	S	2,35	0,217	0,415
	alten Tieres	$S_{\bar{x}}$	0,556	1,14	0,029
B	Zusatz von	$\bar{x}$	14,0	11,17	4,25
	Kollagen eines	S	4,66	0,684	0,69
	jungen Tieres	$S_{\bar{x}}$	2,170	0,078	0,0797

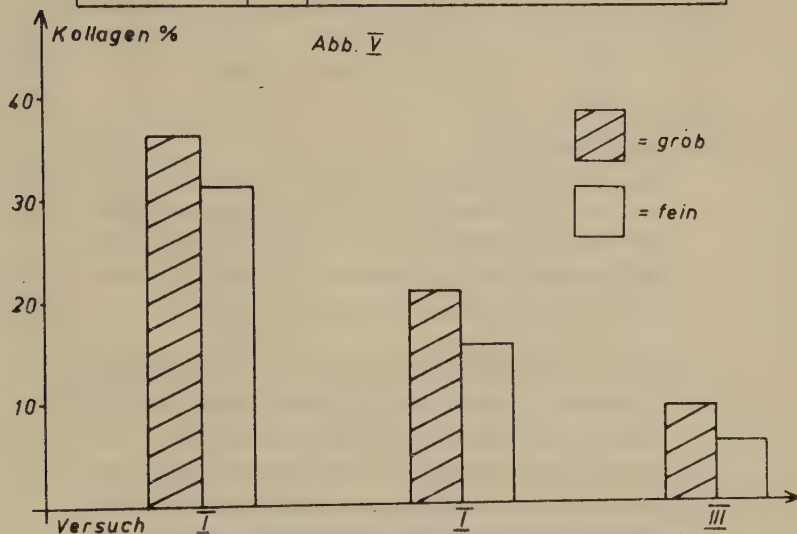


In Versuch I wurde Kollagen eines sehr alten Tieres bzw. eines Fressers zugesetzt. In II und III Kollagen eines älteren Tieres bzw. eines Kalbes. Die Unterschiede der Mittelwerte in der Spalte A gegenüber denen in der Spalte B lassen die Bedeutung des Alters eines Tieres auf den Austritt von Kollagen beim Autoklavieren erkennen. So läßt sich z.B. aus Versuch I und II ersehen, daß bei gleichem Zusatz (25 %) auch unterschiedliche Kollagenvolumina erhalten werden.

Nachfolgend wurde zu 6x100 g Schubfleisch Kollagen (Aponeurosen aus Hessenfleisch) zugesetzt, welches wie folgt zerkleinert war. 2x25 g und 1x10 g wurden im Wolf mit mittlerer Scheibe grobzerkleinert. 2x25 g und 1x10 g mit der Ika-Analysenmühle feinstzerkleinert. Die weitere Verarbeitung entspricht der des vorigen Versuches. Die Ergebnisse zeigt die Tabelle:

Tabelle VI

Versuch		I	II	III	
A	Zusatz von	$\bar{x}$	36,4	20,75	9,75
	grobzerklei-	S	2,87	1,13	1,14
	nertem	$S_{\bar{x}}$	1,37	0,213	0,219
	Kollagen				
B	Zusatz von	$\bar{x}$	32,7	15,5	6,58
	feinzerklei-	S	2,99	1,14	0,42
	nertem	$S_{\bar{x}}$	1,49	0,217	0,029
	Kollagen				



Aus den Ergebnissen dieses Versuches geht also hervor, daß aus feinzerkleinertem Material (Spalte B) mehr Kollagen austritt als aus grobzerkleinertem (Spalte A).

Zum Studium des Einflusses verschieden hoher Erhitzungs-Temperaturen wurde ein zerkleiner-tes und gut durchmisches Brät bei 40°, 60°, 80°, 100°, 110° und 120° C erhitzt. Das Brät kam dazu in eine 0,5 mm starke Aluminium-Folie, in die von oben eine Bi-Metall-Elektrode eingeführt wurde. Auf diese Weise konnte die Einhaltung der jeweils gewünschten Kern-temperaturen im Material kontrolliert werden. Zur Temperaturmessung diente ein Thermo-Element. Die Erwärmung erfolgte bis zu 80° im Wasserbad, darüber hinaus im Autoklaven. Nach Entfettung erfolgte wieder nach bekannter Methode die Aufbereitung. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle VII aufgeführt:

Tabelle VII

	roh	40°	60°	80°	100°	110°	115°	120°
$\bar{x}$	22,83	27,6	25,9	17,9	18,8	17,0	17,1	16,0
S	1,71	1,44	1,82	1,59	1,59	2,07	2,22	2,42
$S_{\bar{x}}$	0,488	0,347	0,557	0,424	0,590	0,717	0,824	0,983

Die Ergebnisse überraschten. Schon bei 40°C war die maximale Quellung erreicht. Zwischen 40° und 60° begann die laufende Abnahme des Kollagenvolumens. Zwischen 40° und 60° ver-leimte das kollagene Gewebe.

In die von sämtlichen Erhitzungsstufen abge-sonderte Flüssigkeit (innerhalb der Alu-Folie) wurden mit Eiweiß-Glyzerin vorbehandelte Objekt-träger eingetaucht, luftgetrocknet und nach Kotter gefärbt. Die Ausstriche färbten sich bei sämtlichen Erhitzungsstufen blau - also wie Kollagen an. In einigen Ausstrichen konnten

sogar Bindegewebsfasern festgestellt werden.

In 2 Fällen wurde Hackbratenbrät autoklaviert. Dazu wurden aus jedem Brät 2 Klopse hergestellt. Der eine Klops eines jeden Bräts wurde ohne Wasseraufguß autoklaviert, der andere jeweils mit Wasseraufguß. Die histologische Aufbereitung erfolgte in üblicher Weise.

Tabelle VIII

		roh	autoklaviert ohne Wasser- aufguß	autoklaviert mit Wasser- aufguß
Versuch	$\bar{x}$	22,8	16,00	11,5
I	S	1,71	2,42	1,17
	$S_{\bar{x}}$	0,488	0,983	0,228
Versuch	$\bar{x}$	35,33	26,91	13,75
II	S	1,24	4,72	2,18
	$S_{\bar{x}}$	1,98	3,723	0,796



Die Kollagen-Abnahme beim Autoklavieren mit Wasseraufguß war beträchtlich höher als die ohne Vorhandensein von Flüssigkeit (t 0,05 p).

Eine ergänzende chemische Untersuchung der Aufgüßflüssigkeit von sterilisiertem Hackbraten ergab das Vorhandensein von Oxyprolin, das offenbar während des Sterilisationsprozesses ausgetreten sein mußte.

Um den Einfluß von trockener Erhitzung im Gegensatz zu feuchter Erhitzung auf den Kollagen-Verlust zu überprüfen, wurde ein Muskel-eiweiß-Kollagen-Gemisch in 7 Teile aufgeteilt und jedes in Schweinedünndärme gefüllt. Diese Würstchen wurden dann unterschiedlich erhitzt (40° , 60° , 80° , 100° , 110° und 120°C).

Zur Innehaltung einer gewissen Luftfeuchtigkeit im Trockenschrank wurde durch Einstellen einer kleinen Schale mit Wasser gesorgt. Die Erhitzung dauerte jeweils 30 Minuten. Anschließend wurde das Material in Formalin fixiert und daraus 10 μ dicke Schnitte hergestellt.

	roh	40°	60°	80°	100°	110°	120°
$\bar{x}$	24,7	28,6	29,2	29,3	30,1	29,9	29,8
S	2,33	3,5	2,46	1,85	2,53	1,52	1,68
$\frac{S}{\bar{x}}$	0,91	2,050	1,014	0,57	1,07	0,389	0,474

Die Werte lassen eine Zunahme des Kollagen-volumens bei 40° erkennen. Die anderen Werte sind untereinander nicht signifikant unterschieden ($p < 0,05$) - d.h. auch bei diesem Material war die maximale Quellung des Kollagens bei 40° - 60° erreicht. Außerdem zeigen die Werte, daß bei trockener Erhitzung keine Kollagen-volumen-Abnahme festzustellen war.

Aus 4 autoklavierten Hackbraten mit verschiedenem Brät wurden jeweils 3 Blöckchen mit einer Kantenlänge von 2x1,5x1 cm herausgeschnitten und in Formalin fixiert. Der jeweilige Rest einer Probe wurde im weiteren nach folgender Methode bearbeitet:
Entfetten mit Methylenchlorid, Einbetten in Na-Alginat, Härten und Fixieren mit CaCl_2 -Formalin, 10 μ dicke Gefrierschnitte.

Tabelle X

Versuch		I	II	III	IV	
A	Hackbraten	$\bar{x}$	25,17	15,83	25,00	16,16
	in Formalin	S	1,87	1,95	2,49	1,52
	fixiert	$S_{\bar{x}}$	0,586	0,636	1,033	0,386
B	Hackbraten	$\bar{x}$	25,72	15,28	24,08	15,83
	in Na-Algi-	S	2,77	0,99	2,50	1,28
	nat einge-	$S_{\bar{x}}$	1,285	0,164	1,044	0,273
	bettet					

Aus Spalte A und B geht also hervor, daß trotz Entfettung und Alginateinbettung von Hackbraten gleiche Ergebnisse erhalten wurden.

D) B e s p r e c h u n g d e r E r g e b n i s s e

Bei der Durchführung der Untersuchungen ergaben sich zunächst in Bezug auf die Methodik Schwierigkeiten. In Müllerscher Flüssigkeit fixiertes Material konnte auf dem Mikrotom nur geschnitten werden, nachdem es in Alginat eingebettet worden war. Zur Alginat-einbettung erwies sich die vollständige Entfettung als notwendig, um ein schneidbares Gefüge zu erhalten. Nur von Brühwürsten konnten ohne Alginat-einbettung 10 μ dicke Schnitte hergestellt werden.

Bei dem Material, das in Alginat eingebettet worden war, mußten zur modifizierten Azanfärbung die Schnitte mit HCl-Lösung vorbehandelt werden. Die dadurch verbesserte spezifische Anfärbung wird nach Angaben von Prändl und Beller auf Strukturveränderungen des Eiweißes zurückgeführt. Durch Säure wird Kollagen aufgelockert, wodurch die Diffusibilität für das Anilinblaumolekül zunimmt, während sich andererseits das Muskeleiweiß verdichtet, so daß innerhalb der kurzen Färbezeit nur das kleinere Orangemolekül in das Muskeleiweiß eindringen kann, nicht aber das größere Anilinblaumolekül.

Eiweiß-Glyzerin - als Haftstoff auf dem Objektträger - färbte sich mit Anilinblau störend an. Aus diesem Grunde wurden die Schnitte auf unbehandelte Objektträger aufgezo-gen. Die Schnitte haften auch bei diesem Verfahren sofort auf dem Objektträger. Die dabei auftretende Falten-

bildung ist durch entsprechend sorgfältiges Arbeiten zu vermeiden. Allerdings erhöht sich der Zeitaufwand beim Aufziehen der Schnitte.

In neuerer Zeit wurde der Wert der Calleja-Färbung mehrfach angezweifelt. Deshalb sollten die Ergebnisse der Calleja-Färbung mit denen der Azan-Färbung (mod. n. Kotter) verglichen werden.

In vorliegenden Untersuchungen wurden 30 Chargen jeweils nach beiden Methoden gefärbt. Bei allen diesen Vergleichen ergab die Überprüfung der Abweichungen durch den t-Test keinen signifikanten Unterschied. Daraus ist also zu schließen, daß mit beiden Färbemethoden auch dann gleiche Ergebnisse zu erhalten sind, wenn es sich um höher erhitztes Material handelt. Das von Bentler beschriebene Versagen der Calleja-Färbung bei über 100°C erhitztem Material konnte in vorliegenden Untersuchungen nicht beobachtet werden. Im übrigen ist es nicht gewerbeüblich, Brühwürste wesentlich über 100°C zu erhitzen. (Bentler-Versuch 5).

Bei den eigenen Untersuchungen traten sowohl bei den nach Calleja als auch bei den nach Azan gefärbten Schnitten nur selten Mischfarben auf. Diese Mischfarben werden als besonderer Nachteil der histometrischen Untersuchungen angesehen. Anscheinend treten sie hauptsächlich bei hohen Kollagengehalten (3. Qualität) auf oder bei Schnitten aus solchem Material, welches mehrmals in der K.S.-

Mühle (K.S. = Kolloid-Struktur) zerkleinert wurde.

Wieso die unter anderem von Wersching und Kovács und auch Schönberg beschriebenen Mischfarben nur bei der Calleja- und nicht bei der Azanfärbung auftraten, obwohl es sich um gleiches Brät handelte, ist nur folgendermaßen zu erklären:

Der Farbkontrast bei der Azanfärbung ist wesentlich deutlicher als der anderer Bindegewebsfärbungen. Mischfarben entstehen entweder durch Vermischung beider Komponenten oder durch Überlagerung. Möglicherweise verdeckt bei der Azanfärbung das dunkel gefärbte Kollagen bei Überlagerungen das hellere Muskeleiweiß derart, daß Mischfarben weniger in Erscheinung treten.

Was die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen anbetrifft, so lautete die Fragestellung, ob und wie sich das Kollagenvolumen nach den einzelnen Fabrikationsabschnitten verändert. Systematische Stufenkontrollen bei der Brühwurstherstellung nach K.S.-Mühlen-Passage ließen eine Abnahme des Kollagenvolumens um ca. 14 % erkennen. Es konnte somit nur durch Herstellung der Kolloid-Struktur das histologische Bild des Brätes "scheinbar" verbessert werden. Diese Beobachtung deckt sich mit den von Linke veröffentlichten Ergebnissen. Das Bindegewebe ist mechanischen Insulten gegenüber resistenter als das Syncytium der quergestreiften Muskelfasern. Bei der Zerstörung der Sarkolemmhülle tritt das Sarkoplasma

aus; dieses wird durch Wasserschüttung und intensive Kutterung bzw. durch Herstellung der Kolloid-Struktur hydratisiert und erfährt dadurch eine Volumenzunahme. Durch die Zerstörung der Sarkolemmhülle entsteht ein Muskeleiweißhydrat-"Schaum" mit einem erheblich größeren Volumen, demgegenüber die zerkleinerten Bindegewebspartikel histometrisch "scheinbar" abgenommen haben, da sie ihr Volumen nicht verändern.

Das Räuchern der Brühwürste hat ebenfalls einen Einfluß auf das Kollagenvolumen. Durch den Temperatureffekt (80-85°C) beim Räuchern nahm das Kollagenvolumen um durchschnittlich 14 Vol.-% zu - erreichte also den Wert wieder, den das roh gekutterte Material hatte. Genau wie die Räucherung ließ auch die Erhitzung in der Petri-Schale in der von Prändl für die histologische Präparation vorgeschriebenen Weise das Kollagenvolumen durchschnittlich um 14 % ansteigen. Diese Zunahme dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die in den Hohlräumen des Brätes eingeschlossenen Wassermengen das Kollagen zum Aufquellen bringen. Die Wasseraufnahmefähigkeit des Kollagens nimmt mit steigender Erhitzung bis zu einer optimalen Temperatur zu, dabei entsteht Leim. Dieser Vorgang ist irreversibel.

Andere Einflüsse als die Räucherung bringt die Erhitzung des Kollagens unter Wasserzutritt mit sich, wie sie bei der Sterilisation von Dosen-Brühwürstchen vor sich geht. Wider Erwarten war bei allen 7 Untersuchungen eine Volumenabnahme des Kollagens (durchschnittlich 33 %)

gegenüber dem rohen, gekutterten Ausgangsmaterial zu verzeichnen.

Bei diesen Stufenkontrollen war das Maximum des Kollagenvolumens nach der Räucherung erreicht. Als Erklärung für die Abnahme wird während der sich anschließenden weiteren Sterilisation folgender Vorgang angenommen:

Das durch die Räucherung verleimte Kollagen wird durch die Aufgußflüssigkeit während der Sterilisation gelöst. Der Salzgehalt der Aufgußlake setzt die Verleimungstemperatur herab (Küntzel); dadurch wird der Lösungsvorgang des Kollagens weitgehend begünstigt. Da einerseits mit steigender Temperatur das Lösungsvermögen für verleimtes Kollagen vergrößert wird, und andererseits mit der Dehydratisierung des Muskeleiweißes Schrumpfungsvorgänge einsetzen, wird das freie Wasser des Brätes und mit ihm das darin gelöste Kollagen aus dem Koagulat ausgepreßt. Durch die verstärkte Bewegung des erhitzten Wassers beim Sterilisieren wird wahrscheinlich dieser Vorgang des "HerauslöSENS" wesentlich verstärkt. Dieses ausgekochte Kollagen konnte in Modellversuchen an Hackbraten in der Aufgußflüssigkeit nachgewiesen werden. Auch von der Herstellung von Fleischkonserven verschiedenster Art, insbesondere Fleisch im eigenen Saft und brühwurstartigen Erzeugnissen wie Jagdwurst, Luncheon meat usw., ist das Heraus-kochen von kollagenhaltiger Flüssigkeit - das sogenannte "Absetzen" - bekannt. Durch Schrumpfung des koagulierten Muskeleiweißes wird auch bei diesen Erzeugnissen das freigewordene

Wasser mit dem darin gelösten Kollagen aus dem Koagulat teilweise ausgepreßt und sammelt sich als Gallerte in der Dose an. Von der Temperaturhöhe bei der Sterilisation und dem Wassergehalt hängt es dann ab, wie "fest" die Gallerte nach dem Abkühlen wird. Bei der Herstellung von Dosenbrühwürstchen wird diese gelöste kollagene Substanz durch die Brühlake herausgewaschen.

Aus den vorliegenden Untersuchungen kann also gefolgert werden, daß neben dem Temperatureffekt auch die Menge des vorhandenen Lösungswassers für die Veränderung des Kollagenvolumens von entscheidender Bedeutung ist. Auch in den Modellversuchen hatte bereits zwischen 40° und 60°C das kollagene Gewebe das Maximalvolumen erreicht, um bei weiterer Erhitzung kontinuierlich abzunehmen. Diese Abnahme des Kollagenvolumens in der erhitzten Fleischmasse war stets mit einem Absetzen gelierender Flüssigkeit kombiniert. Die Ergebnisse der Modellversuche an Hackbraten, die mit und ohne Wasseraufguß autoklaviert wurden, weisen ebenso auf den Einfluß der Flüssigkeit beim Erhitzen hin. Das Kollagenvolumen nahm beim Autoklavieren mit Wasseraufguß beträchtlich stärker ab als ohne das Vorhandensein von Flüssigkeit. Berücksichtigt man die kollagenlösende Wirkung des Kochwassers, so erhält man eine plausible Erklärung dafür, weshalb Gerigk und neuerdings auch Bentler in Dosenwürstchen gleichviel oder sogar weniger Kollagen feststellten als in normal gebrühten Würstchen aus dem gleichen

Brät. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen bestätigen die von Gerigk und Bentler. Sie stehen jedoch im Widerspruch zu denen von Wersching und Kovács sowie auch zu den von Baxevanis veröffentlichten Ergebnissen.

Baxevanis erhitzte Brühwurstbrät, das in Gläser eingefüllt war, auf unterschiedliche Temperaturen und stellte bis zu einer Erhitzung von 100°C ein kontinuierliches Ansteigen des Kollagenvolumens fest; bei Erhitzung über 100°C nahm das Kollagenvolumen wieder ab. Der Einfluß der Würstchenlake wurde von Baxevanis also außer acht gelassen. Damit fänden die widersprüchlichen Feststellungen von Gerigk und Baxevanis in der unterschiedlichen Methodik ihre Erklärung. Welche Ursachen für die Diskrepanz zwischen Wersching's und Kovács's Untersuchungen einerseits und denen von Gerigk, Bentler sowie den vorliegenden Ergebnissen andererseits anzunehmen sind, ist unklar. Zur Klärung dieser Frage müßten die Ergebnisse von Wersching und Kovács reproduziert werden. Möglicherweise finden die unterschiedlichen Ergebnisse der zitierten Autoren ihre Ursache in anderen technologischen Einflüssen, wie z. B. die Art der Räucherung. Auch das Brühwurstkaliber, das in keiner der Arbeiten erwähnt worden ist, dürfte nicht ohne Einfluß auf Veränderungen des Kollagenvolumens sein.

Aus den vorliegenden Brühwurstversuchen ergibt sich also zunächst eine Bestätigung der bekannten Tatsache, daß das Kollagenvolumen beim Erhitzen zunimmt. Diese Zunahme wird aber bei der gewerbeüblichen Herstellung von Dosenbrühwurst durch eine Auflösung des Kollagens in der Aufgußlake kompensiert. Diese Volumenabnahme

im Verlauf des Sterilisationsprozesses war so stark, daß der Kollagenwert des Fertigproduktes den Anfangswert in keinem Falle überschritt, sondern sogar noch erheblich darunter lag.

Zur Prüfung der Frage, welche Volumenänderungen bei der Herstellung von Dosenhackbraten zu erwarten sind, wurden 6 Hackbraten-Chargen in Stufenkontrollen untersucht. Um methodisch vergleichbare Werte zu erhalten, wurde auch das Hackbratenbrät in der feuchten Kammer erhitzt. Somit konnte das Maximum des Kollagengehaltes der Hackbraten-Chargen festgelegt werden. Dieses Maximum wurde im Verlauf des technologischen Herstellungsprozesses regelmäßig während des Frittierens der Hackbratenmasse erreicht.

Eine ähnlich gleichmäßige Abnahme des Kollagenvolumens, wie sie bei der Sterilisation der Brühwürste vorhanden war, bestand bei den autoklavierten Hackbratenkonserven nicht. Die Ursachen für dieses abweichende Verhalten konnten durch Modellversuche folgendermaßen geklärt werden: Durch eine Frittierdauer von mehr als 5 Minuten und hohe Fett-Temperaturen von über 120°C wird eine so starke Kruste um den Fleischklops gebildet, daß der Austritt des gelösten Kollagens verhindert wird. Auf die Bedeutung des Lösungswassers für die Abnahme des Kollagenvolumens während des Sterilisierens wurde bereits hingewiesen. Die Unterschiede der Mittelwerte in Tabelle V lassen außerdem die Bedeutung des Alters eines Tieres für die

Löslichkeit des Kollagens beim Autoklavieren erkennen. Die Kollagenvolumenabnahme war um so deutlicher, je jünger das Tier war.

Gerigk's Beobachtungen, daß aus grobem Material beim Erhitzen weniger Kollagen austritt, konnte durch Modellversuche bestätigt werden. Die Löslichkeit des Kollagens wird mit zunehmendem Zerkleinerungsgrad wegen der gleichzeitigen Zunahme der Oberfläche vergrößert.

Der Auffassung Bentler's, daß das Vorkommen von völlig verleimter Substanz vom Hersteller nicht zu vertreten sei, ist nicht ohne weiteres beizupflichten. Eine hochgradige Verleimung kann auch dort feststellbar sein, wo eine Verfälschung vorliegt, etwa durch Zusatz von vorerhitztem Schwarten-Sehnenblock.

Schlußfolgerungen:

Unterschiedliche technologische Verfahren können sowohl bei der Herstellung von Brühwurst als auch Hackbraten zu Änderungen des Kollagenvolumens führen.

1. Faktoren, die zu einer Erhöhung des Kollagenvolumens führen, sind
 - a) niedrige Brühtemperaturen,
 - b) das Vorhandensein einer optimalen Menge von Quellungswasser,
 - c) grobe Zerkleinerung des Brätes,
 - d) Verarbeitung des Fleisches von alten Tieren.

2. Eine Senkung des Kollagenvolumens gegenüber dem Ausgangswert ist stets bei einem Überschuß an Lösungswasser zu erwarten. Diese Abnahme des Kollagenvolumens wird verstärkt durch folgende Faktoren:
- a) Hohe Sterilisationstemperaturen,
 - b) Feinstzerkleinerung des Brätes,
 - c) Verwendung des Fleisches junger Tiere.

In die histometrische Auswertung muß unstrukturiertes Bindegewebe nach den vorliegenden Untersuchungen stets einbezogen werden.

Bei der gewerbeüblichen Herstellung von Dosenwürstchen und Hackbratenkonserven ist davon auszugehen, daß die Kollagenvolumenzunahme durch gleichzeitige Abnahme kompensiert wird.

Die Grenzwerte zur Beurteilung des Kollagenvolumens von Brühwürstchen und Hackbraten in Dosen können daher auch im Hinblick auf technologische Einflüsse als so hoch angesetzt betrachtet werden, daß ungerechtfertigte Beanstandungen dieser Erzeugnisse nicht zu befürchten sind. Für den Untersuchenden ergibt sich aber dennoch die Notwendigkeit, bei der Bewertung eines histometrischen Befundes die oben erwähnten Faktoren abzuwägen, soweit ein entsprechender Einfluß auf das Untersuchungsergebnis wahrscheinlich ist.

E) Z u s a m m e n f a s s u n g

Vom November 1962 bis September 1963 wurden Stufenkontrollen vom Brühwurstbrät bis zur sterilisierten Dosenbrühwurst und vom Hackbratenbrät bis zur autoklavierten Hackbratenkonserve durchgeführt. Der Kollagenanteil wurde nach Prändl mit dem Point-counter-Verfahren histometrisch ermittelt.

Die Anilinblau-Orange-Färbung wurde an hochertem Material mit der Färbung nach Calleja verglichen. Bei sachgemäßer Ausführung waren zwischen den Ergebnissen beider Färbungen keine statistisch zu sichernden Unterschiede nachweisbar.

Durch die Zerkleinerung des Brühwurstbrätes in der Kolloidmühle verringerte sich der Kollagenanteil gegenüber dem geschrotetem Material um durchschnittlich 14 Vol.%. Während der Räucherung (80-85°C) stieg das Kollagenvolumen wieder um etwa den gleichen Betrag. Nach der Sterilisation wurde gegenüber dem rohen gekutternen Ausgangsmaterial eine Kollagenabnahme von 33 Vol.% festgestellt. Der Einfluß einiger Faktoren, die die Ergebnisse verändern könnten, wurde in Modellversuchen ermittelt. Deshalb sind die oben genannten Zahlenangaben keine allgemeinen quantitativen Aussagen, sondern lassen sich nur auf die vorliegenden Untersuchungsergebnisse beziehen,

Das Kollagenvolumen bei Hackbraten zeigte unterschiedliches Verhalten. Jedoch konnte in keinem Versuch nach dem Autoklavieren ein höheres Kolla-

genvolumen ermittelt werden als im rohen Brät vor der Sterilisation.

Aus den Untersuchungsergebnissen wird geschlossen, daß für die Beurteilung des Kollagenvolumens von Dosenwürstchen und Dosenhackbraten der für "Fleisch wie gewachsen" anerkannte Grenzwert von 30 Vol.% zugrunde gelegt werden kann, ohne daß ungerechtfertigte Beanstandungen befürchtet werden müßten.

F) L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- 1) Alterauge, W. (1937): Histologische Untersuchungen von Brüh-, Rot- und Eingeweidewürsten unter Berücksichtigung der durch den Herstellungsprozeß hervorgerufenen Veränderungen der in der Wurst enthaltenen Organe und Gewebsbestandteile, insbesondere des Lebergewebes.
Hannover, Vet.-med.Diss.
- 2) Baxevanis, D. (1962): Über Einflüsse auf das Kollagen-volumen von Brüh- und Rohwürsten.
München, Vet.-med.Diss.
- 3) Beller, K.-A. (1960): Physikalisch-chemische Untersuchungen zur Anwendung der Anilinblau-Orange-Eisessig-Färbung für die Darstellung von Kollagen.
München, Vet.-med.Diss.
- 4) Bentler, W. (1962): Ein Beitrag zur Vorbehandlung von Rohwurst für die histometrische Auswertung und Vergleichsuntersuchungen verschiedener Zerkleinerungsmethoden.
Arch.Lebensmittelhyg. 13, 88

- 5) Bentler, W. (1962): Bericht über ein geeignetes
Gerät zur Vorzerkleinerung von
Wurst für die histologische Un-
tersuchung.
Arch.Lebensmittelhyg. 13, 163

- 6) Ders. (1963): Untersuchungen über den Einfluß
der Erhitzung auf das histome-
trisch meßbare Kollagenvolumen.
Arch.Lebensmittelhyg. 9, 209

- 7) Bodrossy, L. (1942): Versuche zur Feststellung der
quantitativen histologischen
Zusammensetzung von Würsten.
Zschr.Fleisch-Milchhyg. 53, 51

- 8) Böhm, R. (1956): Phasenkontrastmikroskopische
Studien an Fleischbrät.
Mikroskopie 11, 242

- 9) Braunert, W. (1921): Histologische Analyse von ge-
kochten Fleisch- und Wurstwaren.
Berlin, Vet.-med.Diss.

- 10) Cherbuliez, E.,
J. Jeannerat und
K.H. Meyer (1938): Über Kollagen und verwandte
Substanzen.
Hoppe-Seyler's Zschr.physiol.
Chem. 254, 241

- 11) Claußen, L. (1937): Über den Nachweis von Leber in
Würsten und Fleischgemengen
durch die histologische Unter-
suchung und den Versuch, den Leber-
gehalt mengenmäßig festzustellen.
Zschr.Fleisch-Milchhyg.47, 397

- 12) Delesse, A. (1848): Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches.
Ann.mines 13 (1848) 379
zit n. 61
- 13) Dräger, H. (1933): Die histologische Wurstuntersuchung nebst Vorschlägen für die praktische Anwendung in der tierärztlichen Lebensmittelüberwachung.
Berl.tierärztl.Wschr. 49, 794
- 14) Eberlein, W. (1961): Grundlagen für die Beurteilung des Kollagenvolumens von Rohwürsten.
München, Vet.-med.Diss.
- 15) Edelmann, R. (1920): Lehrbuch der Fleischhygiene
4.Aufl.,Jena: Verl.Fischer,
S. 385
- 16) Endress, R. (1944): Beitrag zur Histologie der Leberwurst.
Zschr.Fleisch-Milchhyg.54,171,182
- 17) Ewald, A. (1919): Beiträge zur Kenntnis des Kollagens.
Hoppe-Seylers Zschr.physiol.
Chem. 105, 115
- 18) Forschner, E. (1961): Volumendifferenzen bei der Histometrie von rohem und erhitztem Fleisch.
Arch.Lebensmittelhyg. 12, 221

- 19) Forschner, E. (1962): Die Beeinflussung histrometrisch ermittelbarer Kollagen-volumina durch die Färbemethode. Arch.Lebensmittelhyg. 13, 203
- 20) Frickinger (1928): Die histologische Untersuchung von Fleischgemengen. Zschr.Fleisch-Milchhyg. 38, 317, 335, 352
- 21) Frickinger (1929): Begutachtung der Wurst durch den Tierarzt mit besonderer Berücksichtigung der histologischen Untersuchung. Zschr.Fleisch-Milchhyg. 39, 105
- 22) Gerigk, K. (1961): Histometrische Untersuchungen von Rohwürsten I. und II. Qualität.
I. Einfluß des Alterns und der Zerkleinerung der Rohwürste auf die histometrischen Ergebnisse.
Fleischwirtschaft 13, 928
- 23) Gerigk, K. (1962): Histologische Beurteilung von Brühwürsten.
Berl.Münch.tierärztl.Wschr. 75, 73
- 24) Giske, W. und R. Grau (1955): Die Eignung des Schnellkutters zur Herstellung von Wurstwaren. Fleischwirtschaft 7, 184

- 25) Glien, R. (1939): Die histologische Untersuchung der von Tieren stammenden Lebensmittel.
Photographie u. Forschg. 2, 54
- 26) Godebille, P. (1912): Etude sur les préparations de charcuterie, andouilles et andouillettes. Composition, analyse et preparation.
Hyg. viande lait 1, 81;
zit. n. 60
- 27) Hadi, A. (1930): Beitrag zur histologischen Untersuchung von Fleischmengen unter besonderer Berücksichtigung der Veränderungen durch das Kochen, Pökeln und durch die Fäulnis.
Berl.tierärztl.Wschr. 46, 261
- 28) Hahn, W. (1962): Zum histometrischen Nachweis von Kollagen in Leberwürsten.
München, Vet.-med. Diss.
- 29) Hartmann, F. (1940): Über die Zuverlässigkeit der histologischen Wurstuntersuchung zum Nachweis von Leber und anderen Organen in Leberwurst und sonstigen Eingeweidewürsten.
Hannover, Vet.-med.Diss.
- 30) Hecht, H. (1957): Zum Nachweis feinerzkleinerter Schwarte in Roh- und Brühwürsten mit der Färbung nach Calleja.
Gießen, Vet.-med. Diss.

- 31) Heine (1941): Nachweis von Leber in Leberwurst.
Dtsch.tierärztl.Wschr.49, 433
- 32) Jaeger, A. (1910): Zur Verarbeitung von "Kalbsgekrösen" in Leberwurst.
Zschr.Fleisch-Milchhag.41, 297
- 33) Kammel, O. (1955): Die bedingte Beweiskraft der histologischen Wurstuntersuchung vor Gericht.
Schlacht-Viehhof-Ztg.1955, 116;
Neue Fleischer-Ztg.1955 Nr.15
- 34) Kelch, F. und K. Gerigk (1960): Zur quantitativen histologischen Untersuchung von Rohwürsten notwendige Anzahl von mikroskopischen Schnitten.
Fleischwirtschaft 12, 718
- 35) Kersch, A. (1956): Zur quantitativen Bestimmung von kollagenen Substanzen in Brühwürsten mittels der histologischen Untersuchungstechnik.
München, Vet.-med. Diss.
- 36) Klimmek, K. (1925): Die Beurteilung von Leberwurst in Bezug auf ihre Zusammensetzung und Preiswürdigkeit.
Zschr.Fleisch-Milchhyg.
35, 121, 137

- 37) Knoch, W. (1956): Untersuchungen über die histologische Feststellung von Schwarte und kollagener Substanz in Brüh- und Rohwürsten nach Feinstzerkleinerung des Brätes und der Schwarte in der Kolloidmühle.
Gießen, Vet.-med. Diss.
- 38) Kotter, L. (1955): Grundzüge und Probleme der histologischen Wurstuntersuchung.
Mitt.GDCh.-Fachgruppe Lebensmittelchemie 36
- 39) Kotter, L. (1955): Neue Wege bei der histologischen Wurstuntersuchung.
Berl.Münch.tierärztl.Wschr. 68, 360
- 40) Kotter, L. (1957): Zum Nachweis kollagener Substanzen in Wurstwaren.
Wiener tierärztl.Mschr.44,705
- 41) Kotter, L.,
E. Degenkolb und
E. Elfert (1955): Zum Nachweis kollagener Substanzen bei der histologischen Wurstuntersuchung.
Tierärztl.Umschau 11 (1956),140
Fleischwirtschaft 7 (1955),673
- 42) Kotter, L. und
O. Prändl (1956): Chemisch-physikalische Vorgänge bei der Brühwurstfabrikation.
Arch.Lebensmittelhyg. 7,219

- 43) Kotter, L. und O. Prändl (1956): Einfluß der Fleischzerkleinerung auf die Zustandsänderung der fibrillären Muskeleiweißkörper. Fleischwirtschaft 8, 688
- 44) Kotter, L. und O. Prändl (1959): Zur Bestimmung des Kollagenanteils in Wurstwaren mit dem Integrationstisch. Zschr.wiss.Mikrosk. 64, 257
- 45) Küntzel, A. (1937): Über die Verleimung des Kollagens Steasny-Festschrift E. Roether-Verl. Darmstadt, S.191
- 46) Leinati, L. und C. Scolari (1950): L'accertamento mediante l'esame istologico dei componenti l'impasto degli insaccati misti stu-fati denominati mortadella. Atti Soc.Ital.Sc.Vet. 4, 635 ref. n. 28)
- 47) Linke, H. (1959): Der Zerkleinerungsgrad von Brühwürsten im histologischen Schnitt bei verschiedenen Kutterungsformen. Fleischwirtschaft 11, 123
- 48) Linke, H. 1959): Histologischer Nachweis von Gehirn in Brühwürsten Fleischwirtschaft 11, 999
- 49) Linke, H. und M. Schadek: (1963): Volumenveränderungen des Muskel- und Kollagengewebes im Verlauf der mikroskopischen Präparationstechnik. Fleischwirtschaft 15, 23

- 50) Lochmann, E.-H. (1962): Die Verteilung des Bindegewebes in zerkleinertem Muskelfleisch, z.B. Hackfleisch in Abhängigkeit von der Durchmischung.
Arch.Lebensmittelhyg.13, 103
- 51) Lochmann, E.-H. (1963): Zur quantitativen Feststellung des Kollagengehaltes in Würsten, insbesondere Brühwürsten, im Rahmen der tierärztlichen Lebensmittelüberwachung.
Arch.Lebensmittelhyg.14, 113
- 52) Lucam, F. und E. Mathieu (1942): Persistance de la structure microscopique du muscle dans les produits de charcuterie.
Bull.Soc.Sc.Vet.Lyon 43, 152
ref.n. 60)
- 53) Lund, L. und E.Schröder (1928): Die Bedeutung der histologischen Wurstuntersuchung.
Dtsch.tierärztl.Wschr.36, 39
- 54) Lund, L. und E.Schröder (1930): Tierärztliche Wurstuntersuchung.
Verl. Schaper, Hannover
S. 127
- 55) Meinel, R. (1961): Beitrag zur histologischen Wurstuntersuchung im Hinblick auf die Qualitätsbeurteilung von Wurstwaren und die Verwendung von Kolloidmühlen.
Mhefte Vet.-med. 16, 391

- 56) Maresch, J. (1951): Der histologische Nachweis von nach neuen Verfahren zerkleinerten Organteilen in Würsten. Wien, Vet.-med. Diss.
- 57) Mayer, M. (1922): Zur Untersuchung und Beurteilung der Würste und ähnlicher Fleischmenge. Zschr.Fleisch-Milchhyg.32, 248; 33, 15
- 58) Poisson, S. (1943): Recherches sur la composition anatomique des produits manipulés de la charcuterie, Technique histologique. Le contrôle des viandes, du lait et d' autre produits alimentaires d' origine animale. Circulaire de la Prefecture de Police. Service Sanitaire Vétérinaire du Département de la Seine. Nr. 1, mars 1943 zit. n. 60)
- 59) Pohl, G. (1939): Erfahrungen und Arbeitsweise bei der Untersuchung und Beurteilung von Zubereitungen von Fleisch auf Nachmachen, Verfälschen, irreführendes Bezeichnen und im Rahmen der Preisüberwachung. Berl.Münch.tierärztl.Wschr.302
- 60) Prändl, O. (1958): Zur Histochemie bei Wurstwaren. Arch.Lebensmittelhyg. 2, 11

- 61) Prändl, O. (1959): Über die Einbettung von Wurstproben für die histologische Untersuchung.
Arch.Lebensmittelhyg. 10, 62
- 62) Prändl, O. (1961): Die histologische Analyse von Wurstwaren.
München, Verl. Röttger
- 63) Rehahn, D. (1956): Untersuchungen über die histologische Feststellung von Geweben und Organen nach Feinstzerkleinerung mit der Kolloidmühle.
Gießen, Vet.-med. Diss.
- 64) Röhrer, H. (1940): Erfahrungen mit der histologischen Wurstuntersuchung.
Zschr.Fleisch-Milchhyg.50, 85
- 65) Seel, E., E. Zeeb
und K. Reiling (1957): zit. nach Lerche, M.,
Goertler, V.
und Rievel, H.
Lehrbuch der tierärztlichen
Lebensmittelüberwachung.
Hannover, Verl. Schaper, S. 457
- 66) Schönberg, F. (1935): Über Erfahrungen bei der histologischen Untersuchung von Wurst, Hackfleisch und Fleischgemengen.
Sitzungsbericht der Berliner
Tierärztl. Ges.
Tierärztl.Rdsch. 41, 185
- 67) Schönberg, F. (1955): Zum Schwartennachweis in Brühwurst und Rotwurst durch die histologische Wurstuntersuchung.
Arch.Lebensmittelhyg. 6, 64

- 68) Schönberg, F. (1956): Zum Nachweis von Schwarten, Pansen und Lunge nach Zerkleinerung in Feinstzerkleinerungsmaschinen.
Arch.Lebensmittelhyg. 7, 264
- 69) Schönberg, F. (1957): Ein Beitrag zur Veränderung der Histostruktur des Muskelfleisches (Skelettmuskulatur) während der Herstellung von Brühwurstbrät.
Arch.Lebensmittelhyg. 8, 121
- 70) Schönberg, F. (1958): Zum mikroskopischen Nachweis von in Kolloidmühle feinstzerkleinerter Leber in Fleischgemengen und Würsten.
Arch.Lebensmittelhyg. 9, 8
- 71) Schönberg, F. (1958): Weitere Untersuchungen zur Veränderung der Histostruktur der Muskelfasern bei der Brühwurstherstellung und zur Notwendigkeit der mikroskopischen Untersuchung von Brühwurst mit starken Vergrößerungen.
Arch.Lebensmittelhyg. 9, 139
- 72) Schönberg, F. (1961): Zur Veränderung der Histostruktur der Muskelfasern und der Skelettmuskulatur überhaupt bei der Brühwurstherstellung, und ein Versuch, die Brühwurstherstellung in einem Schema darzustellen.
Arch.Lebensmittelhyg. 12, 106

- 73) Schröder, E. (1959): Histologische Untersuchungen über die Veränderung des Fleisches beim Kattern unter besonderer Berücksichtigung des interstitiellen Bindegewebes. Berlin FU, Vet.-med. Diss.
- 74) Sinell, H.J. (1961): Zur Frage der Einbettung mit Alginat in der histologischen Wurstuntersuchung. Arch.Lebensmittelhyg. 12, 41
- 75) Skulberg, A. (1954): Undersøkelser over histologisk diagnostikk av opparbeidede kjøttvarer. Nord.Vet.med. 6, 839,937,946
- 76) Schwerdt (1931): Unhaltbare Auffassung über die Herstellung von Fleischwaren und deren Verfälschungen. Berl.tierärztl.Wschr.1931, 253
- 77) Striegel, A. (1917): Quantitative Trennung von Leim und Eiweißstoffen. Chem.-Ztg. 41, 313
- 78) Wegener, J. (1962): Histometrische Kollagenbestimmungen an West-Berliner Rohwürsten. Berlin FU, Vet.-med.Diss.
- 79) Wersching, S und A.S. Kovács (1963): Vergleichende histometrische und chemische Untersuchungen über den Kollagengehalt von Brühwürsten. Arch.Lebensmittelhyg. 14, 1

- 80) Westphal, W. (1942): Histologische Wurstunter-
suchung.
Fleischwirtschaft 22, 37
- 81) Ziegler, M. (1941): Zur histologischen Wurstunter-
suchung.
Berl.Münch.tierärztl.Wschr.
S. 297

Am Schlusse meiner Arbeit möchte ich meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. H.-J. Sinell, für die Überlassung des Themas und die freundliche Beratung meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Lebenslauf

Am 13. 9. 1935 wurde ich als Sohn des Diplomchemikers Dr. Werner Woltersdorf und seiner Ehefrau Klara, geb. Wiedemann in Greifswald geboren.

Von 1942 bis 1950 besuchte ich die Grundschulen in Bernburg/Saale und Greifswald. Im Herbst 1951 wurde ich in die Oberschule in Wolfen/Anhalt aufgenommen und legte an der Oberschule in Heringsdorf am 6. 6. 1955 die Reifeprüfung ab.

Nach dem Besuch des "Sonderlehrganges für Ostabiturienten" erwarb ich am 24. August 1956 die Anerkennung des Reifezeugnisses der sowjetischen Besatzungszone.

Vom Wintersemester 1956 bis zum Wintersemester 1961 studierte ich an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin. An dieser Universität legte ich am 24. 11. 1961 das Staatsexamen ab.

Nach der sechsmonatigen Praktikantenzeit in der tierärztlichen Praxis erhielt ich am 16. Juli 1962 die Approbation. Seit dem 2. September 1962 bin ich am Institut für Lebensmittelhygiene der Freien Universität Berlin tätig, wo die vorliegende Arbeit angefertigt wurde.

